Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr.med. K. Botzenhart
Abteilung Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. K. Botzenhart

Tetracyclineinfluß auf die Produktion extracellulärer Enzyme von Pseudomonas Aeruginosa

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS STADLER
aus Berlin

1984

RIJKS-
LUIDEN
HERB.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0006

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr.med. K. Botzenhart
Abteilung Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. K. Botzenhart

Tetracyclineinfluß auf die Produktion extracellulärer Enzyme von Pseudomonas Aeruginosa

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ANDREAS STADLER
aus Berlin

1984

Dekan:	Professor Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. K. Botzenhart
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. D. Mecke

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

für Eli

Herrn Professor Dr. Konrad Botzenhart danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für das freundliche Interesse, das er an ihrem Fortgang zeigte.
Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Gerd Döring für die intensive Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit bedanken.
Herrn Dr. Hans-Joachim Obernesser danke ich für viele praktische Ratschläge.
Bei Frau Carolyn Bildner möchte ich mich herzlich für Ihre freundliche Hilfe bei der Ausarbeitung der Zeichnungen bedanken.

ABKÜRZUNGEN

AP	alkalische Protease
CF	Cystische Fibrose
Ela	Elastase
GPA	gesamte proteolytische Aktivität
KÜ	Kulturüberstand
LE	Lipaseeinheit
Li	Lipase
MHK	minimale Hemmkonzentration
OD	optische Dichte
PA	Pseudomonas aeruginosa
PBS	phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
PE	Proteaseeinheit
PLC	Phospholipase C
PLCE	Phospholipase C - Einheit
RIA	Radioimmunoassay
s	Standardabweichung
TC	Tetracyclin
TSB	Triptone - Soy - Broth

INHALTSANGABE

1	EINLEITUNG	6
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Stämme	11
2.2	Material	11
2.3	Kulturmethoden	12
2.3.1	TSB-Medium	12
2.3.2	Phosphatfreies Medium	13
2.4	Bakteriendichte	14
2.5	Enzymaktivitäten	14
2.5.1	Gesamte proteolytische Aktivität	14
2.5.2	Alkalische Protease und Elastase	15
2.5.3	Lipase	18
2.5.4	Phospholipase C	18
2.6	Tetracyclin	19
2.6.1	Minimale Hemmkonzentration	19
2.6.2	Nachweis	20
2.6.3	Resistenzverhalten von Pseudomonas aeruginosa	20
2.6.4	Wirkungsdauer	21
2.6.5	Wirkungsmechanismus	21
2.6.6	Einfluß auf gereinigte alkalische Protease	21
2.7	Untersuchungen an Exoenzymen	22
2.7.1	Untersuchung der Stämme	22
2.7.2	Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Wachstum	22
2.7.3	Gesamte proteolytische Aktivität in Abhängigkeit subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen	23
2.7.4	Zeitlicher Verlauf bei zwei subinhibitorischen Tetracyclinkonzentrationen	23

2.2.5	Zeitpunkt der Zugabe zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen	23
2.2.6	Einfluß zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen auf die gesamte proteolytische Aktivität, Lipase und Phospholipase C	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Untersuchung der Stämme	25
3.2	Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Wachstum	25
3.3	Gesamte proteolytische Aktivität in Abhängigkeit subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen	28
3.4	Resistenzverhalten von Pseudomonas aeruginosa	37
3.5	Wirkungsdauer von Tetracyclin	39
3.6	Zeitlicher Verlauf bei zwei subinhibitorischen Tetracyclinkonzentrationen	41
3.7	Zeitpunkt der Zugabe zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen	44
3.8	Einfluß zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen auf die gesamte proteolytische Aktivität, Lipase- und Phospholipase C-Aktivität	48
3.9	Tetracyclineinfluß auf Enzyme	60
3.10	Wirkungsmechanismen von Tetracyclin	63
4	DISKUSSION	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	ANHANG	74
7	LITERATUR	75

E I N L E I T U N G

Pseudomonas aeruginosa (PA) ist ein äußerst anspruchsloses, fakultativ anaerobes, gramnegatives Stäbchenbakterium und kommt ubiquitär vor. Es wird häufig als Bestandteil der menschlichen Mikroflora auf der Haut, in den Atemwegen, im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt gefunden (7).

In den letzten drei Jahrzehnten hat die Anzahl nosokomialer Infektionen durch gramnegative Erreger wie PA stark zugenommen. Dieses ist u.a. auf die vermehrte Anwendung von Antibiotika, die gegen klassische pathogene Erreger erfolgreich eingesetzt werden, zurückzuführen. So können sich opportunistische Keime mit einem breiten Resistenzspektrum wie PA besser entwickeln und die entstandenen "ökologischen Nischen" einnehmen (16;17;19;64). Man fand z.B. bei Lungeninfektionen von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) vor der Anwendung von Antibiotika in 80% der Fälle Staphylokokken im Sputum; heute haben 70 - 90% der CF-Patienten chronische PA-Lungeninfektionen (13;58).
PA-Infektionen treten hauptsächlich als Sekundärinfektionen bei hospitalisierten Patienten auf, Primärinfektionen sind selten (15;63). Neben exogenen sind endogene Infektionsquellen nicht außer Acht zu lassen (7;64). Man findet PA-Infektionen vor allem bei chronischen Krankheitsprozessen.
Eine große Rolle spielen PA-Lungeninfektionen bei CF-Patienten (13;29;30;38), systemische PA-Infektionen bei angeborenen oder erworbenen Störungen des Immunsystems (19;69;75) und PA-Sekundärinfektionen nach Verbrennungen (61). Auch als Erreger von Harnwegsinfektionen hat PA Bedeutung erlangt (19).

Man findet bei PA muköse und nichtmuköse Wachstumsformen. Die Schleimhülle muköser Formen, die hauptsächlich aus

Polysacchariden besteht, scheint unter bestimmten Umständen die Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und biologischen Abwehrmechanismen zu erhöhen und damit den mukösen Formen einen Selektionsvorteil zu bieten (1;7;9;14). Muköse Formen scheinen im Gegensatz zu nichtmukösen u.a. widerstandsfähiger gegen viele Antibiotika zu sein (26; 68).

PA produziert verschiedene extracelluläre Enzyme und Toxine, die für Menschen, Tiere und Pflanzen pathogene Virulenzfaktoren sind: mehrere Proteasen - darunter eine alkalische Protease (AP) und eine Elastase (Ela) -, eine Lipase (Li), eine Phospholipase C (PLC), ein hitzestabiles Hämolysin, ein Exotoxin A und andere.
Auch Glykolipoproteine der Schleimhülle tragen zur Pathogenität von PA bei.
Diese Faktoren wurden zuerst von LIU (41;42) und MORIHARA (44-49) untersucht.

Über die Rolle von PLC und Li bei PA-Infektionen ist wenig bekannt.
PLC hydrolisiert die Bindung zwischen Phosphorsäure und Glyzerin im Lecithin, das u.a. Bestandteil von Zellmembranen ist. Eine alkalische Phosphatase spaltet aus dem freigesetzten Phosphorylcholin Phosphat ab.
Es konnten zentrale Abszesse bei intracutaner und Nekrosen in inneren Organen bei intraperitonealer PLC-Applikation beobachtet werden.
PLC könnte in der Pathogenese von PA-Lungeninfektionen eine wichtige Rolle spielen, da der "Surfactant", der die Oberflächenspannung der Alveolen reduziert, vorwiegend aus Lecithinen besteht. Zerstörung dieser Substanz könnte zu Atelektasen führen (41;42).

Am besten untersucht sind außer dem Exotoxin A zwei Proteasen von PA, die AP und die Ela, die für die Pathogenese von PA-Lungeninfektionen von Bedeutung zu sein scheinen.

Proteasenegative oder wenig Protease produzierende Stämme zeigten sich im Tierversuch weniger virulent als protease-positive Stämme (6;28;34;52;76).
Beide Proteasen verursachen in der Haut Hämorrhagien und Nekrosen in inneren Organen (32;33;41).
Die Hornhaut des Auges kann durch sie zerstört werden (31;37).
Beide Proteasen spalten einige Bestandteile des menschlichen Plasmas: Ela spaltet IgA und IgG, AP spaltet nur IgA (11;51;62). Ela spaltet außerdem sekretorisches IgA, AP nicht (11).
Nach intranasaler Applikation von Ela fand man bei Kaninchen Lungenhämorrhagien (27). Auch bei PA-Lungeninfektionen des Menschen findet man Blutungen in der Lunge und vermutet, daß sie von Proteasen verursacht werden.

Die Therapie von PA-Infektionen gestaltet sich äußerst schwierig. PA verfügt über eine hohe primäre Antibiotikaresistenz. Außerdem zeigt PA eine schnelle Resistenzentwicklung, die wohl hauptsächlich auf Plasmidaustausch zurückzuführen ist (21;65).
Auf Grund des breiten Resistenzspektrums und der schnellen Resistenzentwicklung gibt man heute einer Kombinationstherapie den Vorzug. Dabei kommen neben semisynthetischen Penicillinen (Carbenicillin, Ticarcillin) und Aminoglykosiden (Gentamycin, Tobramycin) seit kurzem auch PA-spezifische Cephalosporine (Cefoxatim, Cefsulodin) zur Anwendung (20;75;85).
Für eine antibiotische Therapie, die möglichst eine Elimination des Erregers anstrebt, müssen hohe Dosen eingesetzt werden. Die Komplikationsrate steigt an ohne daß der Erfolg gesichert ist, denn man erreicht vor allem bei PA-Lungeninfektionen meistens keinen dauerhaften Rückgang der Keimzahl (50;55;63).

Ein anderer therapeutischer Ansatz könnte der Versuch sein, gezielt die von PA gebildeten Virulenzfaktoren zu

reduzieren, denn diese sind wohl für seine Pathogenität entscheidend.
Die Synthese extracellulärer Enzyme reagiert bei einigen Bakterien sehr viel empfindlicher auf Hemmstoffe der Proteinbiosynthese als die Gesamtproteinbiosynthese (2;20; 24;72;73;78). Diese Mittel könnten also sehr viel niedriger dosiert werden, als es für eine antibiotische Therapie notwendig wäre. Entsprechend geringer würden auch die Nebenwirkungen sein. Als Beispiel könnte die schon länger praktizierte Anwendung von Tetracyclin (TC) in der Akne-Therapie gelten. TC hemmt die Proteinbiosynthese, in dem es die Anlagerung des Aminoacyl-tRNA-Komplexes an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms verhindert (53).
Der von einigen Autoren beschriebene Therapieerfolg soll damit zusammenhängen, daß TC über eine selektive Hemmung der Li-Produktion von u.a. Corynebacterium acnes zu einer Erniedrigung des Fettsäuregehaltes im Talgdrüsensekret führt (67;77).

An der Universitätskinderklinik Tübingen konnte NIESSEN beobachten, daß bei Patienten mit PA-Lungeninfektionen unter TC-Medikation oft eine Besserung der Beschwerden eintrat (54). Dieses dürfte nicht auf eine antibiotische Wirkung des TC zurückzuführen sein, da über 95% aller PA-Stämme gegen TC resistent sind (81). Möglicherweise hängt die Wirkung mit einem selektiven Effekt des TC auf die Synthese extracellulärer Enzyme von PA zusammen.
Dieser selektive Effekt von TC scheint nach einigen Beobachtungen tatsächlich vorzuliegen (57;74;79).
SHIBL und AL-SOWAYGH konnten zeigen, daß die Proteaseproduktion eines PA-Stammes bereits bei sehr niedrigen TC-Konzentrationen (< 1 µg/ml) deutlich erniedrigt war, ohne daß das Wachstum beeinflußt war (74).
Für die PLC von PA konnten STINSON und HAYDEN einen ähnlichen Effekt zeigen (79).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf die Produktion extracellulärer Enzyme von PA-Stämmen untersucht.
Bei den untersuchten Enzymen handelte es sich um die beiden Proteasen AP und Ela, um die Li und die PLC.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme

Die verwendeten 12 Pseudomonas aeruginosa (PA)-Stämme stammen zum größten Teil von Patienten des Tübinger Universitätsklinikums.
Die Stämme 1, 5, 6, 8 und 10 wurden aus dem Sputum von Patienten mit CF isoliert, die Stämme 7 und 11 aus Urin und der Stamm 4 aus Eiter.
Die Stämme 2 und 9 sind die HABS-Referenzstämme 2 und 10, der Stamm 3 ist der American Type Culture Collection-Stamm Nr. 9721 (ATCC 9721).
Weitere Daten zu den Stämmen sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

2.2 Material

Alle verwendeten Materialien stammen von der Firma E. MERCK, Darmstadt, mit folgenden Ausnahmen:
Columbia-Agar-Base, Tryptone-Soy-Broth, Nutrient-Broth-Nr.2, D.S.T.-Agar und Egg-Yolk-Emulsion von OXOID Ltd., Wesel.
Bacto-Agar, Hefe und Tryptose von DIFCO Laboratories, Stuttgart.
Azocasein, Tween 60 und p-Nitrophenylphosphorylcholin von SIGMA GmgH, München.
Natriumsuccinat und Tributyrin von SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg.
Rinderserumalbumin von BEHRINGWERKE AG, Marburg.
Doxycyclin - als Vibravenös^{R}-Ampullen - von PFIZER GmbH, Karlsruhe.
PVC Mikrotiterplatten von FALCON Plastics, Heidelberg.
Gereinigte AP und Ela und Kaninchen-IgG-Antikörper gegen AP und Ela wurden freundlicherweise von Dr. Gerd Döring,

Hygieneinstitut der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

2.3 Kulturmethoden

Untersuchungen an PA wurden in Schüttelkulturen durchgeführt. Schikanekolben wurden verwendet, um das Wachstum und damit die Enzymausbeute zu erhöhen.
Vorkulturen wurden durchgeführt, um die PA-Zellen zu synchronisieren, also möglichst Keime aus gleichen Wachstumsphasen in die Hauptkulturen überimpfen zu können, und damit gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

2.3.1 TSB-Medium

Dieses Medium wurde für Untersuchungen an der alkalischen Protease (AP), der Elastase (Ela) und der Lipase (Li) verwendet. Es bietet gute Wachstumsbedingungen für PA. Die meisten untersuchten Stämme befanden sich nach 24 Stunden in der stationären Phase.
Die Stämme wurden 24 Stunden bei 37°C auf Blutagar inkubiert (39g Columbia-Agar-Base, 3g Bacto-Agar und 50g defibriniertes Hammelblut auf 1 l Aqua dest.).
Für die Vorkultur wurde eine Öse Material in einen 0,1 l Erlmeyerkolben mit 3 Schikanen übertragen, der 20 ml Tryptone-Soy-Broth (TSB) enthielt. Er wurde bei 37°C 12 Stunden in einem Schüttelinkubator (INFORS AG, Basel) bei 130 Umdrehungen pro Minute (UPM) inkubiert.
1 ml der Vorkultur wurde in einem 1 l Erlmeyerkolben mit 3 Schikanen überimpft, der 200 ml TSB mit 0,5% Hefe und 1% Glukose enthielt.
Diese Hauptkultur wurde bei 30°C und 130 UPM je nach Versuchsdauer in dem Schüttelinkubator inkubiert.
Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und bei 10 000 g und 4°C 20 Minuten zentrifugiert (SORVALL RC-5B refrigerated superspeed centrifuge, DUPONT DE

NEMOURS GmbH, Bad Nauheim). Der Kulturüberstand (KÜ) wurde zur Messung der Enzymaktivitäten verwendet (s. 2.5), das Bakteriensediment zur Messung der Bakteriendichte (s. 2.4).

2.3.2 Phosphatfreies Medium

Eine Phospholipase C (PLC) wird von PA gebildet und sezerniert, wenn nicht ausreichend anorganisches Phosphat im Medium vorhanden ist. PLC hydrolisiert die Bindung zwischen Phosphorsäure und Glycerin im Lecithin und setzt Verbindungen frei, die als Phosphatquellen dienen. Im schwach alkalischen Bereich ist die PLC-Aktivität am höchsten.
Für Untersuchungen an der PLC wurde ein phosphatfreies Medium nach STINSON und HAYDEN benutzt (79).
Da PA in diesem Medium langsamer wächst, wurde die Vorkultur länger inkubiert und mehr Material in die Hauptkultur übertragen.
Die Stämme wurden 24 Stunden bei 37°C auf Eigelb-Lecithin-Agar inkubiert. Dieser setzte sich aus 25g Nutrient-Broth-Nr.2, 15g Agar-Agar und 50g Egg-Yolk-Emulsion auf 1 l Aqua dest. zusammen.
Das Medium enthielt 14,54g Tris; 2,64g $(NH_4)_2SO_4$; 0,75g KCl; 0,24g $CaCl_2$; 1g Tryptose und 6,48g Natriumsuccinat auf 1 l Aqua dest..
Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 8,0 eingestellt.
Für die Vorkultur wurde von der Agarplatte eine Öse Material in einen 0,1 l Erlmeyerkolben mit 3 Schikanen übertragen, der 20 ml Medium enthielt. Er wurde bei 30°C 24 Stunden in dem Schüttelinkubator bei 110 UPM inkubiert. 4 ml der Vorkultur wurden in einem 1 l Erlmeyerkolben mit 3 Schikanen überimpft, der 200 ml Medium enthielt. Diese Hauptkultur wurde bei 30°C und 110 UPM je nach Versuchsdauer in dem Schüttelinkubator inkubiert.
Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

2.4 Bakteriendichte

Zur Bestimmung der Bakteriendichte wurden die durch Zentrifugieren der Proben gewonnenen Bakteriensedimente (s. 2.3) mit physiologischer NaCl-Lösung bis zur homogenen Verteilung auf das ursprüngliche Volumen aufgeschwemmt. Es wurden Verdünnungen (10^{-1}; 10^{-2} und 10^{-3}) hergestellt und die optische Dichte (OD) bei geeigneter Verdünnung mit einem Spektralphotometer (Typ UV 5230, BECKMANN Instrumente GmbH, München) bei 578 nm gemessen. Für die Nullwerte wurde physiologische NaCl-Lösung verwendet.

2.5 Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die durch Zentrifugieren der Proben gewonnenen KÜs benutzt (s. 2.3).

2.5.1 Gesamte proteolytische Aktivität

Zur Bestimmung der gesamten proteolytischen Aktivität (GPA) wurde die von PRESTIDGE u.a. (59) beschriebene Azocasein-Methode benutzt.
Azocasein dient hier als Proteasesubstrat. Produkte seiner Spaltung durch Proteasen sind perchlorsäurelösliche, chromophore Substanzen; unverbrauchtes Azocasein wird durch Perchlorsäure gefällt.
Beide von PA gebildete Proteasen, sowohl die AP als auch die Ela, reagieren mit Azocasein. Es ist nicht möglich, die beiden Enzyme getrennt zu bestimmen. Mit diesem Test wird also die "gesamte proteolytische Aktivität" im KÜ gemessen. DÖRING und OBERNESSER konnten feststellen, daß Ela etwa um den Faktor 10 aktiver reagiert als AP (10; 11).
Ein Reaktionsgemisch aus 0,1 ml Aqua dest.; 0,1 ml Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 und 0,5 ml 2%iger Azocaseinlösung wurde je nach erwarteter Enzymaktivität 20 bis 60 Minuten bei

30°C mit 0,3 ml KÜ inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml kalter, 7%iger Perchlorsäure gestoppt, der Ansatz bei 15 Minuten bei 4000 g und 4°C zentrifugiert (Minifuge GL, HERAEUS CHRIST GmbH, Osterode), der Überstand in 0,3 ml 10 N NaOH abpipettiert und die Extinction bei 430 nm mit dem Spektralphotometer gemessen. Für die Nullwerte wurde statt KÜ 0,3 ml Aqua dest. in das Reaktionsgemisch gegeben. Wenn hohe Enzymaktivitäten zu erwarten waren, mußte der KÜ geeignet mit Aqua dest. verdünnt werden.
Die Extinctionswerte sind bis zu einem Wert von 0,6 proportional zur EPA.
Eine Enzymeinheit (PE) wurde bezogen auf eine OD von 1 bei 430 nm pro Minute und pro ml KÜ.

2.5.2 Alkalische Protease und Elastase

Zwei von DÖRING und OBERNESSER entwickelte Radioimmunoassays (RIAs) dienten zur Messung der AP und Ela (12; 56). Das Schema ist in der Abbildung 1 dargestellt. Kaninchen-IgG-Antikörper gegen AP bzw. Ela wurden in einer Konzentration von 10^{-2} mg/ml in phosphatgepufferter physiologischer Salzlösung (PBS) gelöst und die feste Phase von PVC-Mikrotiterplatten mit 100 µl dieser Lösung je Näpfchen beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Näpfchen dreimal mit PBS gespült, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen. Die Zugabe von 100 µl 5%iger Rinderserumalbuminlösung (RSA-Lösung) in PBS je Näpfchen verminderte die unspezifische Bindung der radioaktiv markierten Antikörper.
Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Näpfchen wieder dreimal mit PBS gewaschen. Diese Platten waren dann einige Wochen bei 4°C lagerbar. Von den KÜs wurden 1:10-Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-8} in PBS hergestellt und je Näpfchen 100 µl einpipettiert. Von jeder Verdünnungsstufe wurden Doppelbestimmungen

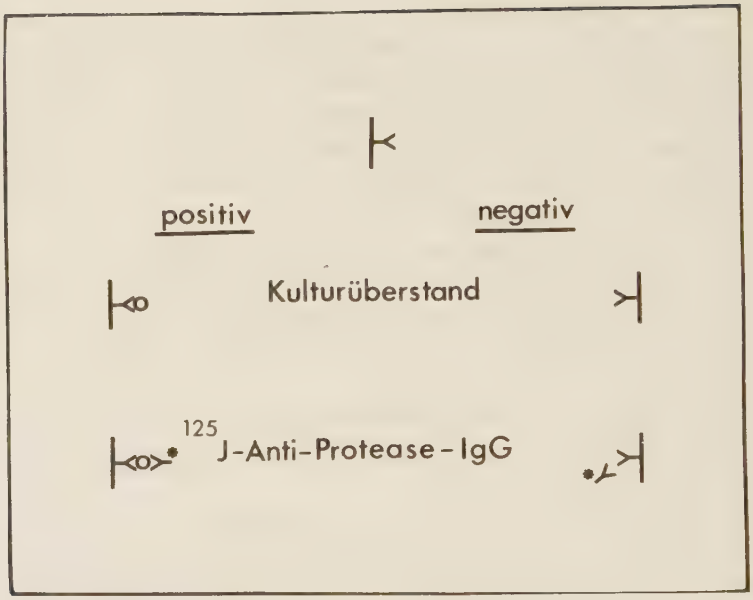

Abb.1 Schema* des RIA zur Bestimmung der AP bzw. Ela im KÜ

Die Näpfchen der PVC-Mikrotiterplatte wurden mit Anti-AP bzw. Anti-Ela-Kaninchen-IgG beschichtet und 12 Stunden bei $4^{o}C$ mit KÜ inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurde ^{125}J-Anti-AP bzw. ^{125}J-Anti-Ela-IgG zugegeben und 12 Stunden bei $4^{o}C$ inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die gebundene Radioaktivität gemessen.

* Das Schema stellte Herr Dr.H.J.Obernesser freundlicherweise zur Verfügung

durchgeführt.
Von der gereinigten Protease (AP oder Ela) wurden 1 : 10-Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-6} mg/ml in PBS hergestellt und für die quantitative Bestimmung der AP bzw. Ela je Verdünnungsstufe zwei Proben in jeder Platte mitgeführt.
Die Platten wurden 12 Stunden bei 4°C inkubiert und die Näpfchen dann dreimal mit PBS gespült.
Es wurde eine Lösung von (^{125}J)IgG gegen AP bzw. Ela in PBS mit 5% RSA hergestellt und auf 200 000 counts per minute (cpm) eingestellt.
Von dieser Lösung wurden 100 µl in jedes Näpfchen gegeben und die Platten 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nachdem die Näpfchen dreimal mit PBS gewaschen waren, wurde die Radioaktivität in jedem Näpfchen mit einem Multi-Crystal-Gamma-Counter (Typ LB 2100, BERTHOLD Laboratorium, Wildbad) gemessen.
Die quantitative Bestimmung der AP- bzw. Ela-Konzentration im KÜ erfolgte folgendermaßen:
Die Titrationskurve für die AP bzw. Ela wurde erhalten, indem die gebundene Radioaktivität (in cpm) auf der Ordinate im linearen Maßstab und die Verdünnungen der jeweiligen gereinigten Protease und der KÜs auf der Abszisse im logarithmischen Maßstab aufgetragen wurden.
Die Eichkurve für die jeweilige Protease und die Titrationskurven der jeweiligen KÜs sollen in einem Bereich linear verlaufen und zueinander parallel sein.
Die zulässige Abweichung in der Steigung der Titrationskurven zur Eichkurve wurde willkürlich auf 10° festgesetzt, was einem maximalen Fehler von 30% entspricht.
Die Berechnung der AP- bzw. Ela-Konzentration X in mg/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$X = \frac{\text{Menge der AP}^{*} \text{ bzw. Ela}^{*} \text{ (mg/ml)}}{\text{Verdünnung des KÜ}^{*}}$$

* Verdünnung des KÜ und der Menge der entsprechenden Protease bei demselben cpm-Wert im linearen Teil der Kurve.

2.5.3 Lipase

Für den Nachweis von Li wurde Tributyrin als Substrat verwendet. Es wird von Li gespalten und die freigesetzte Buttersäure kann titrimetrisch bestimmt werden.
Es wurde ein Reaktionsgemisch erstellt, das 2,5 ml KÜ, 1 ml einer Pufferlösung aus 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 und 0,2 M NaCl und 1,5 ml einer 5%igen Tributyrinlösung enthielt. Die Tributyrinlösung wurde vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch mit 0,2% Tween 60 zehn Minuten in einem Ultraschallgerät (Bransonic 221 Sonifier, BRANSON Ultraschall GmbH, Heusenstamm) emulgiert.
Die Reaktionsmischung wurde 12 Stunden lang bei 37°C auf einem Mischgerät (Typ Reax, HEIDOLPH Elektro KG, Kehlheim) über Kopf geschüttelt, die Reaktion durch Eiskühlung gestoppt und die freigesetzte Buttersäure titrimetrisch mit 0,02 N NaOH und Phenolphtalein als Indikator bestimmt. Nullwerte wurden durch Erhitzen von KÜs auf 100°C für 10 Minuten vor der Inkubation hergestellt.
Als eine Enzymeinheit (LE) wurde die Li-Menge definiert, die 1 µEquivalent Buttersäure pro Minute und pro ml KÜ freisetzt.

2.5.4 Phospholipase C

Für den Nachweis von PLC wurde die Methode von KURIOKA und MATSUDA (39) in abgewandelter Form verwendet.
Als Substrat für PLC dient farbloses p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC).
Aus der Reaktion entsteht durch Abspaltung von Phosphorylcholin gelbes p-Nitrophenol (NP), dessen Menge über die Extinction ermittelt wird.
Das Substratgemisch bestand aus einer Pufferlösung (0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 und 0,2 M NaCl), 60% Glyzerin, 3 mM $CaCl_2$ und 2 mM NPPC.
Der Reaktionsansatz enthielt 2,5 ml des Substratgemisches und 0,5 ml KÜ.

Je nach erwarteter Enzymaktivität wurde 20 bis 120 Minuten bei 37°C inkubiert und die Extinction bei 410 nm mit dem Spektralphotometer gemessen.
Für die Nullwerte wurde statt KÜ 0,5 ml der Pufferlösung verwendet.
Bei Eigenfärbung des KÜ wurde mit Pufferlösung geeignet verdünnt.
Um die erhaltene Extinction in nMol freigesetztes NP umzurechnen, wurde eine Eichkurve erstellt.
Die Extinction ist bis zu einem Wert von 0,7 proportional zur freigesetzten Menge NP.
Eine Enzymeinheit (PLCE) wurde definiert als die Enzymmenge, die ein nMol NP pro Minute und pro ml KÜ freisetzt.

2.6 Tetracyclin

Die Tetracyclin (TC)-Stammlösung (Vibravenös^{R}) enthielt nach Angaben des Herstellers 20 mg Doxycyclin pro ml Lösung.
Sie wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 1 : 10 oder 1 : 20 verdünnt, um geeignete Gebrauchslösungen zu erhalten.
Es wurden jeweils Doppelansätze gemacht und alle Werte zweimal bestimmt.

2.6.1 Minimale Hemmkonzentration

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von TC für die verwendeten PA-Stämme wurden Vorkulturen wie unter 2.3.1 beschrieben angezüchtet.
Um unterschiedliche Bakteriendichten auszugleichen und die Ausgangskonzentration der Keime zu normieren, wurden die Vorkulturen mit physiologischer NaCl-Lösung so verdünnt, daß sich eine OD von 0,18 bis 0,22 bei 578 nm ergab.

Je Stamm wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 der TC-Gebrauchslösung in TSB hergestellt. Es wurden dafür 10 ml Schraubdeckelgläser verwendet, die je 3,5 ml TSB enthielten.
Für Kontrollen wurde statt der TC-Gebrauchslösung physiologische NaCl-Lösung verwendet.
Jedes Glas erhielt nun 20 µl der Vorkultur.
Die Gläser wurden 48 Stunden bei 37°C inkubiert, dann wurde anhand der Trübung die kleinste TC-Konzentration ermittelt, bei der gerade kein Wachstum mehr aufgetreten war. Diese wurde als MHK von TC für den betreffenden PA-Stamm definiert.

2.6.2 Nachweis

Um TC im KÜ semiquantitativ nachzuweisen, wurde eine mikrobiologische Aktivitätsbestimmung auf Sporen-Agarplatten durchgeführt.
Diese setzten sich aus 40g D.S.T.-Agar und 0,25 ml einer Bacillus-subtilis (BGA)-Sporensuspension (10^7 Sporen pro ml) auf 1 l Aqua dest. zusammen.
Es wurden je Platte mit einem Korkbohrer drei Löcher (3 mm Ø) ausgestanzt und mit je 10 ul des KÜ oder der TC-Kontrollen beschickt.
Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde abgelesen.
Der Durchmesser aufgetretener Hemmhöfe wurde in mm bestimmt und mit denen der mitgeführten TC-kontrollen (1 µg bzw. 4 µg/ml) verglichen.

2.6.3 Resistenzverhalten von Pseudomonas aeruginosa

Der Stamm PA-1 wurde wie unter 2.3.1 beschrieben, angezüchtet. Es wurden zwei Hauptkulturen angesetzt.
Eine Hauptkultur enthielt 1 µg TC/ml, die andere diente als Kontrolle.
Die Messungen begannen mit dem Überimpfen der Vorkultur.
Nach 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden wurde je 1 ml Mate-

rial in eine neue Hauptkultur überimpft, die 1 µg TC/ml enthielt. Nach 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden wurden 2 ml Proben entnommen und Bakteriendichte und GPA wie beschrieben ermittelt (s. 2.3.1, 2.4 und 2.5.1).
Mit der Kontrolle wurde in gleicher Weise verfahren.

2.6.4 Wirkungsdauer

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 und 11 erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.
Für jeden Stamm wurden zwei Hauptkulturen angesetzt, denen 1 µg bzw. 4 µg TC/ml zugesetzt wurden.
12, 24 und 48 Stunden nach Überimpfen der Vorkulturen wurden jeweils 1 ml Proben entnommen und KÜ wie unter 2.3.1 beschrieben gewonnen.
Mit dem unter 2.6.2 beschriebenen Agardiffusionstest wurde dann TC semiquantitativ nachgewiesen.

2.6.5 Wirkungsmechanismus

Der Stamm PA-11 wurde wie unter 2.3.1 beschrieben angezüchtet.
Es wurden zwei Hauptkulturen angesetzt.
Eine diente als Kontrolle, der anderen wurde 4 µg TC/ml zugesetzt.
12 Stunden nach Überimpfen der Vorkultur wurden 2 ml Proben entnommen und Bakteriendichte, GPA und Ela wie beschrieben ermittelt (s. 2.3.1, 2.4, 2.5.1 und 2.5.2).

2.6.6 Einfluß auf gereinigte alkalische Protease

Von gereinigter AP wurden drei Verdünnungen von 1 mg; 0,5 mg und 0,1 mg/ml in PBS hergestellt.
Der Ansatz enthielt 1 ml einer AP-Verdünnung und 1 ml einer TC-Lösung, die 2 mg/ml enthielt, so daß die Endkonzentration von 1 mg TC/ml vorlag.
Für Kontrollen wurde statt AP-Verdünnung 1 ml PBS be-

nutzt.
Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die proteolytische Aktivität wie unter 2.5.1 beschrieben ermittelt.

2.7 Untersuchungen an Exoenzymen

Bei den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden jeweils Doppelansätze gemacht und für jeden Ansatz Bakteriendichte und Enzymaktivitäten zweimal bestimmt.

2.7.1 Untersuchung der Stämme

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 bis 12 erfolgte wie unter 2.3 beschrieben in TSB- und phosphatfreiem Medium.
Für jeden Stamm wurde mit jedem Medium eine Hauptkultur angesetzt.
24 Stunden nach Überimpfung der Vorkulturen wurden je 10 ml Proben entnommen und Bakteriendichten, GPA, AP, Ela, Li und PLC wie beschrieben ermittelt (s. 2.3, 2.4 und 2.5).

2.7.2 Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Wachstum

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 und 11 erfolgte wie unter 2.3 beschrieben in TSB- und phosphatfreiem Medium.
Von den Hauptkulturen mit TSB-Medium wurden 5, 10, 15, 24, 29, 34 und 49 Stunden nach Überimpfen der Vorkulturen je 10 ml Proben entnommen; von den Hauptkulturen mit phosphatfreiem Medium erfolgte die Probenentnahme nach 10, 15, 20, 24, 34, 39, 45 und 58 Stunden.
Bakteriendichten, GPA, AP, Ela, Li und PLC wurden wie beschrieben ermittelt (s. 2.3, 2.4 und 2.5).

2.7.3 Gesamte proteolytische Aktivität in Abhängigkeit subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 und 11 erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.
Bei PA-1 wurden 11 Hauptkulturen angesetzt. 10 enthielten TC in Konzentrationen von 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 und 5,0 µg/ml.
Bei PA-11 wurden 13 Hauptkulturen angesetzt. 12 enthielten TC in Konzentrationen von 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 und 10,0 µg/ml.
Jeweils eine Hauptkultur ohne TC diente als Kontrolle.
10 und 24 Stunden nach Überimpfen der Vorkulturen wurden 2 ml Proben entnommen und Bakteriendichten sowie GPA wie beschrieben ermittelt (s. 2.3.1, 2.4 und 2.5.1).

2.7.4 Zeitlicher Verlauf bei zwei subinhibitorischen Tetracyclinkonzentrationen

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 und 11 erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.
Für jeden Stamm wurden zwei Hauptkulturen angesetzt.
Jeweils eine enthielt bei PA-1 1 µg TC/ml und bei PA-11 4 µg TC/ml.
Jeweils eine Hauptkultur diente als Kontrolle.
4, 8, 11, 15 und 24 Stunden nach Überimpfen der Vorkultur wurden 2 ml Proben entnommen und Bakteriendichten sowie GPA wie beschrieben ermittelt (s. 2.3.1, 2.4 und 2.5.1).

2.7.5 Zeitpunkt der Zugabe zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 und 11 erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.
Für jeden Stamm wurden drei Hauptkulturen angesetzt.
Bei PA-1 wurde dem ersten Ansatz 4 Stunden und dem

zweiten Ansatz 8 Stunden nach Überimpfen der Vorkultur je 1 µg TC/ml zugegeben, der dritte Ansatz diente als Kontrolle.
Nach 4, 8, 11, 15 und 24 Stunden wurden 2 ml Proben entnommen und Bakteriendichten und GPA wie beschrieben ermittelt (s. 2.3.1, 2.4 und 2.5.1).
Bei PA-11 wurde in gleicher Weise mit 4 µg TC/ml verfahren.

2.7.6 Einfluß zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen auf die gesamte proteolytische Aktivität, Lipase und Phospholipase C

Das Anzüchten der PA-Stämme 1 bis 12 erfolgte wie unter 2.3 beschrieben in TSB- und phosphatfreiem Medium.
Für jeden Stamm wurden je drei Hauptkulturen mit beiden Medien angesetzt.
Jeweils eine Hauptkultur diente als Kontrolle, den beiden anderen wurden je 1 µg bzw. 4 µg TC/ml zugesetzt.
Von den Hauptkulturen mit TSB-Medium wurden 12, 24 und 48 Stunden nach Überimpfung der Vorkulturen je 10 ml Proben entnommen; von den Hauptkulturen mit phosphatfreiem Medium erfolgte die Probenentnahme nach 24 Stunden und nach 48 Stunden.
Bakteriendichten, GPA, Li und PLC wurden wie beschrieben ermittelt (s. 2.3, 2.4, 2.5.1, 2.5.3 und 2.5.4).

ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Stämme

Die Pseudomonas aeruginosa (PA)-Stämme 1 bis 12 wurden auf ihre gesamte proteolytische Aktivität (GPA), Produktion von alkalischer Protease (AP) und Elastase (Ela), Lipase (Li)- und Phospholipase C (PLC)-Aktivität hin untersucht (s. 2.7.1). Außerdem wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Tetracyclin (TC) für diese Stämme wie unter 2.6.1 beschrieben ermittelt.

In der Tabelle 1 ist die GPA in PE, die AP und die Ela in µg/ml, die Li in LE, die PLC in PLCE und die MHK von TC in µg/ml aufgeführt.

Aus den Bakteriendichten nach 24 Stunden wurde für die Kulturen im TSB- und im phosphatfreien Medium jeweils ein Mittelwert gebildet. Er lag, als OD bei 578 nm ausgedrückt, bei 15,3 für die Kulturen im TSB-Medium und bei 0,12 für die Kulturen im phosphatfreien Medium.
Für die Enzymwerte wurden Mittelwerte aus 4 Messungen gebildet, diese auf das jeweilige mittlere Wachstum bezogen und entsprechend umgerechnet.
PA-2 konnte im phosphatfreien Medium nicht angezüchtet werden.

Nach den MHK-Werten sind alle Stämme als resistent einzustufen.

3.2 Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Wachstum

Die Abhängigkeit der Li und PLC, die GPA und die Menge an AP und Ela in Abhängigkeit vom Wachstum wurde untersucht (s. 2.7.2).

Tab. 1 Daten zu den verwendeten PA-Stämmen

PA-Stamm	GPA (PE)	AP (µg/ml)	Ela (µg/ml)	Li (10^{-5} LE)	PLC (PLCE)	MHK (µg/ml)
1	0,54	184,3	26,2	29,0	1,83	60
2	0,66	74,9	33,7	42,0	-	60
3	2,07	97,3	195,5	10,2	1,09	250
4	0,81	27,0	60,0	18,7	0,64	250
5	0,41	26,1	15,1	15,0	1,42	60
6	2,18	13,6	205,9	9,2	4,02	60
7	2,19	65,2	127,8	32,8	2,44	120
8	2,05	34,8	125,5	47,4	2,41	120
9	0,30	24,8	19,6	79,5	1,07	120
10	3,08	86,0	163,2	37,0	1,40	120
11	1,56	66,3	157,0	52,0	1,57	250
12	0,16	56,0	29,4	45,0	2,37	30

Enzymaktivitäten bzw. -mengen nach 24 Stunden Wachstum in TSB- (für GPA, AP, Ela und Li) bzw. phosphatfreiem Medium (für PLC), bezogen auf eine mittlere Bakteriendichte ($OD_{578\ nm}$) von 15,3 im TSB- bzw. 0,12 im phosphatfreien Medium. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leq 5\%$). Die MHK von TC wurde in einem Reihenverdünnungstest bestimmt.

Es wurden zwei Stämme mit verschiedener TC-Sensibilität und verschiedener AP- und Ela-Produktion ausgewählt: PA-1 und PA-11.
Der Stamm PA-1 produzierte von den untersuchten Stämmen am meisten AP und hatte eine MHK von 60 µg TC/ml.
PA-11 hatte eine hohe Ela-Produktion und eine MHK von 250 µg TC/ml.
Beide Stämme produzierten AP, Ela, Li und PLC (Tab.1).

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen den Verlauf der GPA, der AP- und Ela-Mengen und der Li-Aktivität in Abhängigkeit vom Wachstum im TSB-Medium.
Die Abbildungen 4 und 5 zeigen den Verlauf der PLC-Aktivität in Abhängigkeit vom Wachstum in phosphatfreiem Medium.
In den Abbildungen 2 bis 5 ist das Wachstum als OD bei 578 nm, die GPA in PE, AP und Ela in µg/ml, Li in LE und PLC in PLCE im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit in h im linearen Maßstab aufgetragen.
Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.

Bei PA-1 (Abb. 2) ergaben sich folgende Verläufe:
Das Wachstum (Kurve 1) stieg bis 10 Stunden steil an, ging dann in die stationäre Phase über, erreichte nach 24 Stunden sein Maximum und fiel dann ab.
Die GPA (Kurve 2) folgte im Verlauf dem Wachstum, erreichte ebenfalls nach 24 Stunden das Maximum und fiel nicht mehr ab.
Bei der AP (Kurve 3) und der Ela (Kurve 4) fanden sich die gleichen Verläufe wie bei der GPA.
Die Li (Kurve 5) stieg steil an, erreichte nach 15 Stunden ihr Maximum, blieb bis 24 Stunden konstant und fiel dann wieder ab.
Bei PA-11 lagen die gleichen Verläufe vor.
Da im phosphatfreien Medium die Wachstumsbedingungen ungünstiger sind, wurden nur geringe Bakteriendichten erreicht.

Bei PA-1 (Abb. 4) stieg das Wachstum (Kurve 1) bis 24 Stunden an und blieb dann praktisch konstant.
Die PLC (Kurve 2) stieg bis 34 Stunden an, hatte dort ihr Maximum, blieb bis 39 Stunden konstant und fiel dann langsam ab.
Bei PA-11 (Abb. 5) stieg das Wachstum (Kurve 1) bis 24 Stunden an und blieb konstant.
Die PLC (Kurve 2) stieg bis 39 Stunden an, erreichte dort ihr Maximum, blieb bis 45 Stunden konstant und fiel dann langsam ab.

PLC und Li fielen nach Erreichen ihres Maximums in der frühen stationären Wachstumsphase wieder ab.
AP und Ela dagegen, und damit auch die GPA, blieben nach Erreichen ihres Maximums in der frühen stationären Wachstumsphase praktisch konstant.
Trotz der hohen AP-Produktion war die GPA bei PA-1 um etwa den Faktor 4 kleiner als bei PA-11, der hauptsächlich Ela produzierte.
Die Ela ist also ausschlaggebend für die GPA.

Um den Einfluß von TC auf die Enzymproduktion zu untersuchen, kann man sich auf die logarithmische und frühe stationäre Wachstumsphase beschränken.
Im TSB-Medium hatten nach 24 Stunden alle untersuchten Enzyme ihr Maximum erreicht und die beiden Stämme befanden sich in der stationären Wachstumsphase.
Die folgenden Untersuchungen wurden daher in diesem Zeitraum durchgeführt.

3.3 Gesamte proteolytische Aktivität in Abhängigkeit subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen

Der Einfluß verschiedener subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf das Wachstum und die GPA von PA-1 und PA-11 wurde untersucht (s. 2.7.3).

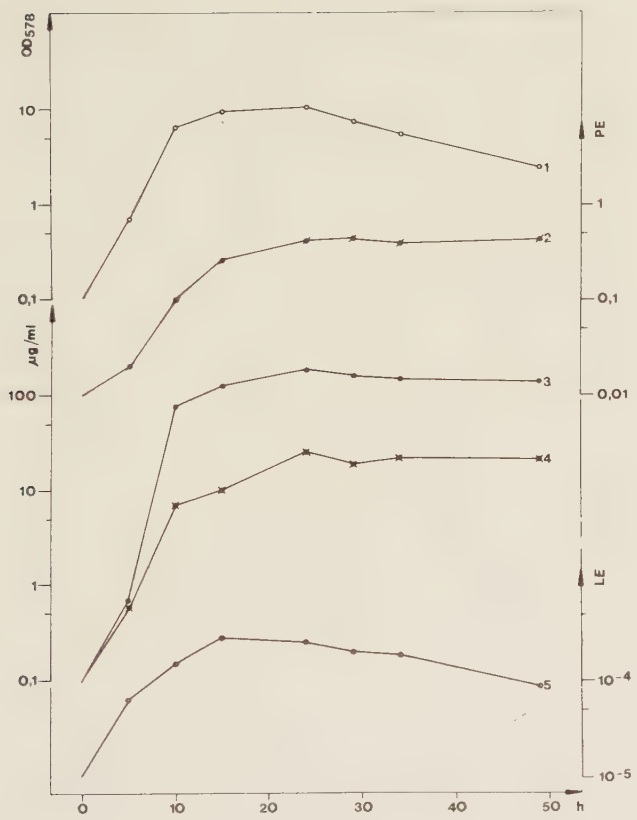

Abb.2 Enzymaktivitäten von PA-1 in Abhängigkeit vom Wachstum in TSB-Medium

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum (Kurve 1) als OD bei 578 nm; GPA (Kurve 2) in PE; AP (Kurve 3) bzw. Ela (Kurve 4) in µg/ml; Li (Kurve 5) in LE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leqslant 5\%$).

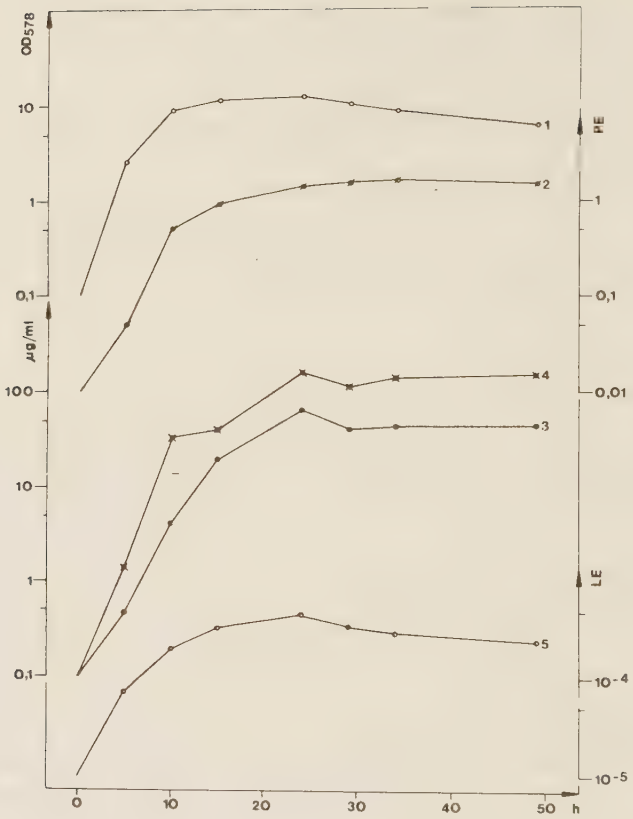

Abb.3 Enzymaktivitäten von PA-11 in Abhängigkeit vom Wachstum in TSB-Medium

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum (Kurve 1) als OD bei 578 nm; GPA (Kurve 2) in PE; AP (Kurve 3) bzw. Ela (Kurve 4) in µg/ml; Li (Kurve 5) in LE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leqslant 5\%$).

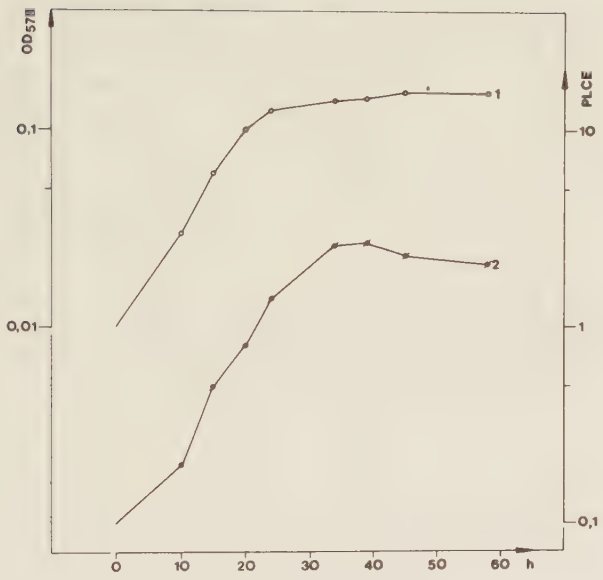

Abb.4 PLC-Aktivität von PA-1 in Abhängigkeit vom Wachstum in phosphatfreiem Medium

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum (Kurve 1) als OD bei 578 nm; PLC (Kurve 2) in PLCE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leqslant 10\%$).

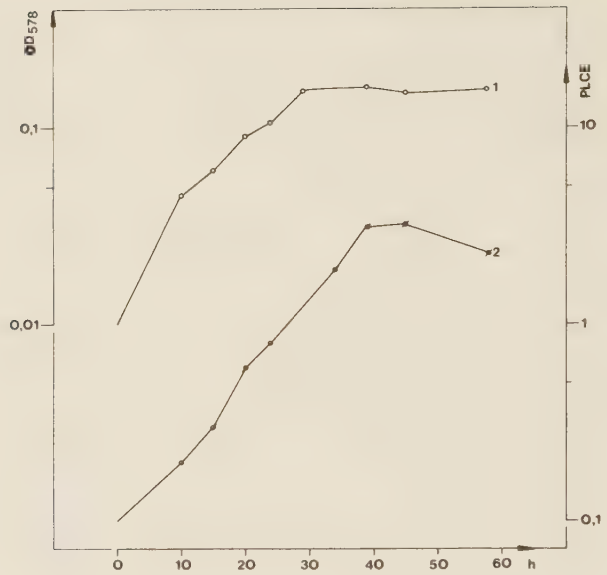

Abb.5 PLC-Aktivität von PA-11 in Abhängigkeit vom Wachstum in phosphatfreiem Medium

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum (Kurve 1) als OD bei 578 nm; PLC (Kurve 2) in PLCE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leqslant 10\%$).

In den Abbildungen 6 und 7 sind Bakteriendichten und GPA der TC-behandelten Hauptkulturen, in % der unbehandelten Kontrollen ausgedrückt, gegen die TC-Konzentration in µg/ml aufgetragen.
Kurve 1 zeigt die Bakteriendichten nach 10 bzw. 24 Stunden Wachstum, Kurve 2 die GPA nach 10 Stunden und Kurve 3 die GPA nach 24 Stunden Wachstum. Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.
Bei den Bakteriendichten war das jeweilige Verhältnis zwischen TC-behandelter Hauptkultur und Kontrolle nach 10 und 24 Stunden bei dieser Untersuchung praktisch gleich (Abweichung der Mittelwerte $\leq$ 5%), so daß hier nur eine Kurve dargestellt ist.

Bei PA-1 (Abb. 6) blieb das Wachstum bis 1,5 µg TC/ml unbeeinflußt, fiel bis 2,5 µg TC/ml steil auf 55% des Kontrollwertes ab und ging dann langsam bis auf 33% des Kontrollwertes bei 5 µg TC/ml zurück.
Die GPA ging nach 10 Stunden bis 1,0 µg TC/ml auf 20% des Kontrollwertes zurück und fiel dann nur noch geringfügig bis auf 18% bei 5 µg TC/ml.
Die GPA nach 24 Stunden war höher: sie fiel bis 1,5 µg TC/ml auf 30% des Kontrollwertes und ging dann nur noch langsam bis auf 25% bei 5 µg TC/ml zurück.
Bei PA-11 (Abb. 7) blieb das Wachstum bis 4 µg TC/ml unbeeinflußt und fiel dann ab bis auf 50% des Kontrollwertes bei 10 µg TC/ml.
Die GPA nach 10 Stunden ging bis 2 µg TC/ml auf 35% des Kontrollwertes zurück, fiel dann langsam bis auf 20% des Kontrollwertes bei 5 µg TC/ml und veränderte sich bis 10 µg TC/ml nicht mehr.
Die GPA nach 24 Stunden ging bis 2 µg TC/ml auf 83% des Kontrollwertes zurück, fiel dann bis 5 µg TC/ml auf 20% des Kontrollwertes ab und veränderte sich bis 10 µg TC/ml nicht mehr.

Bei den Wachstumskurven ergaben sich drei Phasen:
Niedrige TC-Konzentrationen hatten keinen Einfluß auf das Wachstum.
Ab einer Konzentration, die von der TC-Empfindlichkeit des Stammes abzuhängen scheint (bei PA-1 1,4 µg TC/ml; bei PA-11 4 µg TC/ml) fiel das Wachstum ab, und zwar je nach Abhängigkeit von der TC-Empfindlichkeit steil (bei PA-1) oder flach (bei PA-11).
Bei höheren Konzentrationen (ab 2,5 µg TC/ml bei PA-1; ab 7 bis 9 µg TC/ml bei PA-11) zeigte sich nur noch ein geringer Rückgang des Wachstums.
Der Übergang von der zweiten in die dritte Phase war bei PA-1 deutlicher ausgeprägt als bei PA-11.

Auf die GPA wirkte das TC in allen Phasen:
Anfangs hatten schon kleine TC-Konzentrationssteigerungen einen starken Abfall der GPA zur Folge.
Bei höheren Konzentrationen ging die GPA praktisch nicht weiter zurück; relativ zur Keimdichte erhöhte sie sich sogar. Hier fielen Änderung der Hemmung der GPA und des Wachstums zusammen, wobei aber die GPA stärker gehemmt blieb als das Wachstum.
TC bewirkte in Konzentrationen, die auf das Wachstum dieser Stämme keinen Einfluß hatten, eine deutliche Erniedrigung der GPA. Höhere TC-Konzentrationen führten dann kaum noch zu einer weiteren Erniedrigung.
Nach 10 Stunden trat die Hemmung der GPA früher auf und war deutlicher ausgeprägt als nach 24 Stunden.
Vor allem bei kleinen TC-Konzentrationen ging die Hemmung zwischen 10 und 24 Stunden deutlich zurück.
Bei steigenden Konzentrationen wurde der Unterschied geringer und verschwand.
Eine Erklärung dafür wäre, daß die TC-Wirkung konzentrationsabhängig abnimmt. Entweder erfolgt eine Aktivitätsabnahme des TC oder die Keime adaptieren sich kurzfristig an TC. Eine Rolle spielt sicher auch die Tatsache, daß bei geringen TC-Konzentrationen aufgrund des ungestör-

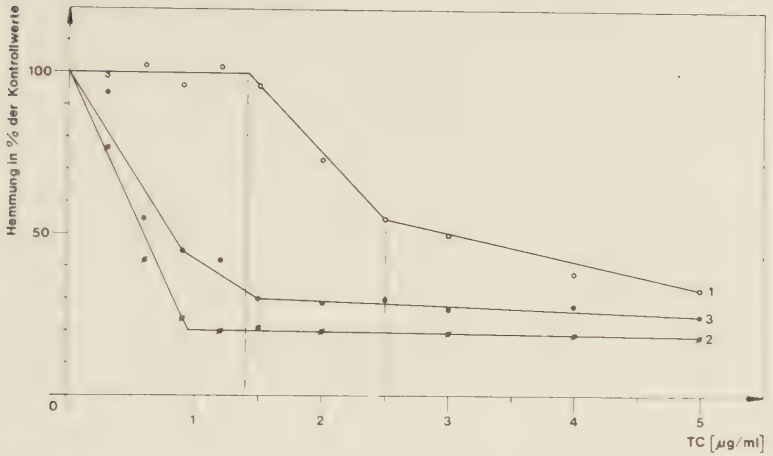

Abb.6 GPA von PA-1 in Abhängigkeit subinhibitorischer TC-Konzentrationen

Ordinate: Wachstum und GPA unter TC-Einfluß, jeweils in % der Kontrollwerte ohne TC. Abszisse: TC-Konzentration in µg/ml. Kurve 1: Wachstum nach 10 bzw. 24 Stunden; Kurve 2: GPA nach 10 Stunden; Kurve 3: GPA nach 24 Stunden. Mittelwerte aus je 4 Messungen (s ≤5%).

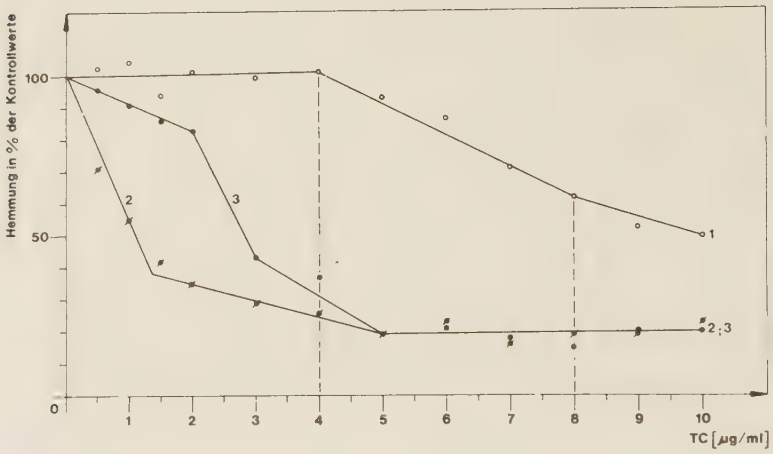

Abb.7 GPA von PA-11 in Abhängigkeit subinhibitorischer TC-Konzentrationen

Ordinate: Wachstum und GPA unter TC-Einfluß, jeweils in % der Kontrollwerte ohne TC. Abszisse: TC-Konzentration in µg/ml. Kurve 1: Wachstum nach 10 bzw. 24 Stunden; Kurve 2: GPA nach 10 Stunden; Kurve 3: GPA nach 24 Stunden. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leq 5\%$).

ten Wachstums schließlich zu wenig TC vorhanden ist, um alle Keime zu erfassen und ihre Enzymproduktion zu hemmen, denn bei steigenden TC-Konzentrationen wird ja der Unterschied zwischen den 10- und 24-Stundenwerten der GPA immer geringer. Diese Punkte wurden im Folgenden näher untersucht.
Der Verlauf der GPA in Abhängigkeit vom Wachstum sollte unter dem Einfluß einer TC-Konzentration beobachtet werden, die das Wachstum nicht, die GPA aber stark hemmte. Es wurde eine TC-Konzentration von 1 µg TC/ml für PA-1 und von 4 µg TC/ml für PA-11 für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.4 Resistenzverhalten von Pseudomonas aeruginosa

Der Einfluß von 1 ug TC/ml auf die GPA von PA-1 über 60 Stunden wurde untersucht (s. 2.6.3).
Es sollte geklärt werden, ob sich die Keime kurzfristig an TC anpassen können.
Um die Keime in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten und damit eine ständige Produktion und Sekretion von Proteasen zu gewährleisten, wurden die Keime wie beschrieben mehrfach in neue TC-haltige Kulturen überimpft. Außerdem konnte so über den gesamten Zeitraum der Messung eine annähernd gleichbleibende TC-Konzentration aufrecht erhalten und eine mögliche Aktivitätsabnahme des TC vermieden werden.

In der Abbildung 8 ist das Wachstum als OD bei 578 nm und die GPA in PE im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit in h im linearen Maßstab aufgetragen.
Kurve 1 zeigt das Wachstum, Kurve 2 die GPA der Kontrolle und Kurve 3 die GPA undter 1 µg TC/ml.
Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.
Die Wachstumskurven der TC-behandelten und der TC-unbehandelten Hauptkulturen verliefen in dieser Untersuchung

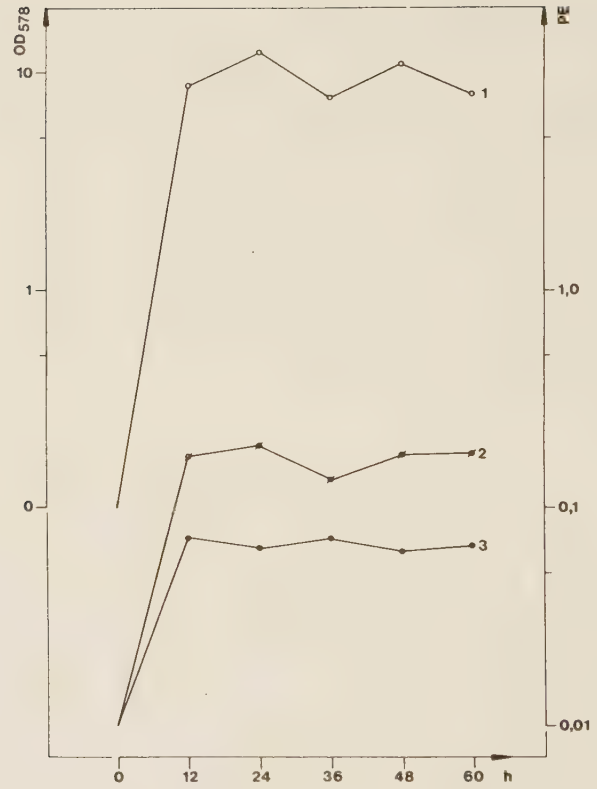

Abb.8 Einfluß von 1 µg TC/ml auf die GPA von PA-1

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum als OD bei 578 nm; GPA in PE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Kurve 1: Wachstum mit bzw. ohne TC; Kurve 2: GPA ohne TC; Kurve 3: GPA bei 1 µg TC/ml. Mittelwerte aus je 4 Messungen (s $\leq$5%).
Die Keime wurden alle 12 Stunden in neues TC-haltiges Medium überimpft.

praktisch gleich (Abweichung der Mittelwerte $\leq$ 5%), so daß nur eine dargestellt ist.

Die GPA der TC-behandelten Hauptkultur blieb über den gesamten Zeitraum der Messung auf $\pm$ 45% der Kontrollwerte. Eine Erholung der Keime - zumindest im Beobachtungszeitraum - fand nicht statt, denn in diesem Fall wäre die GPA der TC-behandelten Hauptkultur angestiegen. Der Wiederanstieg der GPA nach anfänglicher Hemmung unter TC (s. 3.3) scheint also auf eine Aktivitätsabnahme des TC zurückzuführen zu sein.

Um diesen Punkt abzuklären, wurde die Wirkungsdauer von TC untersucht.

3.5 Wirkungsdauer von Tetracyclin

Die Wirkungsdauer von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml unter Kulturbedingungen wurde untersucht (s. 2.6.4).
Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.
Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.
Da auf eine genaue quantitative TC-Bestimmung verzichtet wurde, wurden die Hemmhofdurchmesser der TC-Kontrollen (1 µg bzw. 4 µg TC/ml) gleich gesetzt und die Werte der Proben im Verhältnis zu ihren entsprechenden Kontrollen dargestellt.

Es zeigte sich, daß die antibiotische Wirkung von 1 µg TC/ml nach 12 Stunden auf die Hälfte abgesunken, nach 24 Stunden gerade noch nachweisbar und nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar war.
Bei 4 µg TC/ml hielt die Wirkung länger an, hier war die Wirkung erst nach 24 Stunden auf die Hälfte abgesunken und auch nach 48 Stunden noch nachweisbar.
TC verliert also unter den hier verwendeten Kulturbedingungen konzentrationsabhängig schnell an Wirkung.

Tab. 2 Wirkungsdauer von TC

	1,0 µg TC/ml	4,0 µg TC/ml
Kontrolle	+ + + +	+ + + +
12 h	+ +	+ + +
24 h	(+)	+ +
48 h	-	(+)

Bestimmung der Aktivität von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml im KÜ nach 12, 24 und 48 Stunden im Vergleich zu Kontrolllösungen

Semiquantitativer Nachweis mit einem Agardiffusionstest: Das Untersuchungsmaterial wurde auf Sporenagarplatten aufgebracht und der Durchmesser der Hemmhöfe nach 24 Stunden Inkubation gemessen.

Die Hemmhofdurchmesser der Kontrollen sind gleichgesetzt; die Hemmhofdurchmesser der Proben sind im Verhältnis zu ihren jeweiligen Kontrollen dargestellt.

Mittelwerte aus je 4 Messungen.

3.6 Zeitlicher Verlauf bei zweisubinhibitorischen Tetracyclinkonzentrationen

Der Verlauf der GPA in Abhängigkeit vom Wachstum unter dem Einfluß von 1 µg TC/ml bei PA-1 und 4 µg TC/ml bei PA-11 wurde untersucht (s. 2.7.4).

In den Abbildungen 9 und 10 ist das Wachstum als OD bei 578 nm und die GPA in PE im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit in h im linearen Maßstab aufgetragen.
Kurve 1 zeigt das Wachstum, Kurve 2 die GPA der Kontrolle und Kurve 3 die GPA unter 1 µg bzw. 4 µg TC/ml.
Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.
Die Wachstumskurven der TC-behandelten und der TC-unbehandelten Hauptkulturen verliefen in diesen Untersuchungen praktisch gleich (Abweichungen der Mittelwerte $\leq 5\%$), so daß hier nur eine Kurve dargestellt ist.

Bei PA-1 ergab sich unter dem Einfluß von 1 µg TC/ml folgender Verlauf (Abb. 9, Kurve 3):
Die GPA fiel nach 8 Stunden auf 18% des Kontrollwertes ab, stieg nach 11 Stunden wieder auf 42% an und lag nach 24 Stunden bei 55% des Kontrollwertes.
Bei PA-11 ergab sich unter dem Einfluß von 4 µg TC/ml folgender Verlauf (Abb. 10, Kurve 3):
Die GPA lag nach 8 Stunden bei 5% des Kontrollwertes, nach 11 Stunden bei 2% und nach 24 Stunden bei 3% des Kontrollwertes.

Der Rückgang der Hemmung der GPA bei 1 µg TC/ml bei PA-1 beruhte wohl auf dem TC-Wirkungsverlust.
Bei PA-11 blieb die GPA niedrig, da mehr TC eingesetzt werden konnte als bei PA-1, ohne das Wachstum zu beeinflussen.
Der Unterschied zu den entsprechenden Werten in 3.1 bei PA-11 könnte damit zusammenhängen, daß sich die Stämme durch längere Lagerung in ihren Eigenschaften

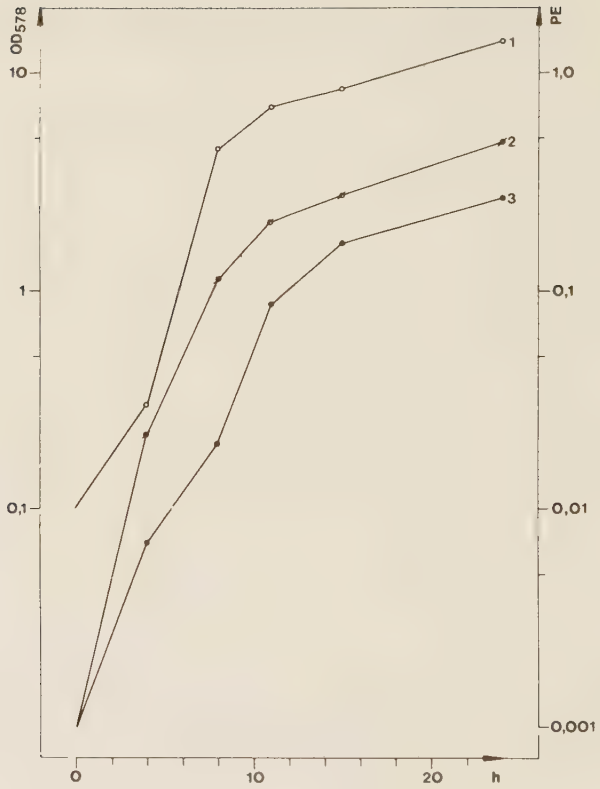

Abb.9 Verlauf der GPA von PA-1 bei 1 µg TC/ml

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum als OD bei 578 nm; GPA in PE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Kurve 1: Wachstum mit bzw. ohne TC; Kurve 2: GPA ohne TC; Kurve 3: GPA bei 1 µg TC/ml. Mittelwerte aus je 4 Messungen (s $\leq$10%).

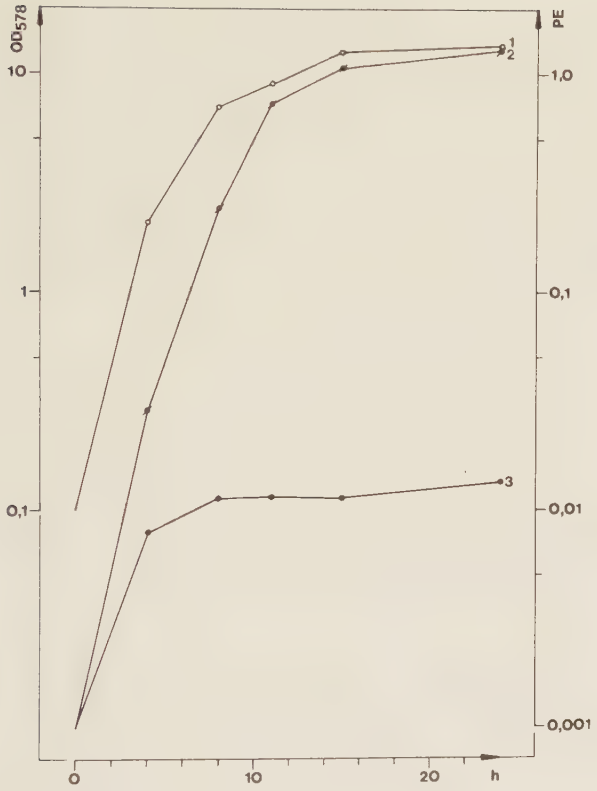

Abb.10 Verlauf der GPA von PA-11 bei 4 µg TC/ml

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum als OD bei 578 nm; GPA in PE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Kurve 1: Wachstum mit bzw. ohne TC; Kurve 2: GPA ohne TC; Kurve 3: GPA bei 4 µg TC/ml. Mittelwerte aus je 4 Messungen (s ≤10%).

verändern können.
Die TC-Wirkung auf die GPA von PA-Stämmen scheint auch, unabhängig von der Sensibilität eines Stammes und der Bakteriendichte, abhängig von der vorhandenen TC-Menge zu sein.

Es sollte nun der Einfluß der bisher bei beiden Stämmen verwendeten TC-Konzentration auf die GPA bei Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums geprüft werden.

3.7 Zeitpunkt der Zugabe zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen

Der Verlauf der GPA in Abhängigkeit vom Wachstum unter dem Einfluß von 1 µg TC/ml bei PA-1 und 4 µg TC/ml bei PA-11 bei Zugabe des TC zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums wurde untersucht (s. 2.7.5).

In den Abbildungen 11 und 12 ist das Wachstum als OD bei 578 nm und die GPA in PE im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit in h im linearen Maßstab aufgetragen.
Kurve 1 zeigt das Wachstum, Kurve 2 die GPA der Kontrolle, Kurve 3 und Kurve 4 die GPAs bei Zugabe von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml 4 und 8 Stunden nach Überimpfung der Vorkulturen.
Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.
Die Wachstumskurven der TC-behandelten und der TC-unbehandelten Hauptkulturen verliefen in dieser Untersuchung praktisch gleich (Abweichung der Mittelwerte $\leq 5\%$), so daß hier nur eine Kurve dargestellt ist.

Bei PA-1 ergab sich folgender Verlauf (Abb. 11):
Bei Zugabe von 1 µg TC/ml 4 Stunden (Kurve 3) nach Überimpfen der Vorkultur fiel die GPA nach 11 Stunden auf 33% des Kontrollwertes und lag nach 24 Stunden bei 43%; bei Zugabe nach 8 Stunden (Kurve 4) lag die GPA

nach 11 und nach 24 Stunden bei 84%.
Bei PA-11 ergab sich folgender Verlauf (Abb. 12):
Bei Zugabe von 4 µg TC/ml 4 Stunden (Kurve 3) nach Überimpfen der Vorkultur lag die GPA nach 11 und nach 24 Stunden bei 3% des Kontrollwertes; bei Zugabe nach 8 Stunden (Kurve 4) fiel die GPA nach 11 Stunden auf 31% des Kontrollwertes und lag nach 24 Stunden bei 58%.
TC-Zugabe nach 4 Stunden hat praktisch die gleiche Wirkung wie Zugabe am Anfang, während sich bei TC-Zugabe nach 8 Stunden bei 1 µg (PA-1) fast keine Wirkung mehr und bei 4 µg (PA-11) eine deutlich geringere Wirkung zeigt. TC wirkt vor allem zu Beginn der Wachstumsphase - je früher es gegeben wird, desto größer ist die Hemmung der GPA.
Die Hemmung der GPA scheint auch von der TC-Konzentration abhängig zu sein. Bei PA-1, der für geringere TC-Konzentration als PA-11 empfindlich war, ließ sich eine stärkere Hemmung der GPA ohne Wachstumsbeeinflussung nicht erreichen.
Während 1 µg TC/ml nach 8 Stunden, gegeben bei PA-1, praktisch keine Wirkung mehr hatte, reduzierten 4 µg TC/ml, ebenfalls nach 8 Stunden gegeben, bei PA-11 die GPA nach 24 Stunden um etwa die Hälfte.
Das hängt einmal von dem konzentrationsabhängigen Wirkungsverlust des TC ab (s. 3.5); zum anderen reicht wohl 1 µg TC/ml - im Gegensatz zu 4 µg TC/ml - nicht aus, bei der hohen Bakteriendichte nach 8 Stunden noch eine deutliche Hemmung zu bewirken.

Der TC-Einfluß auf die GPA wurde bei weiteren PA-Stämmen untersucht.
Auch die Wirkung auf andere Exoenzyme wurde untersucht.

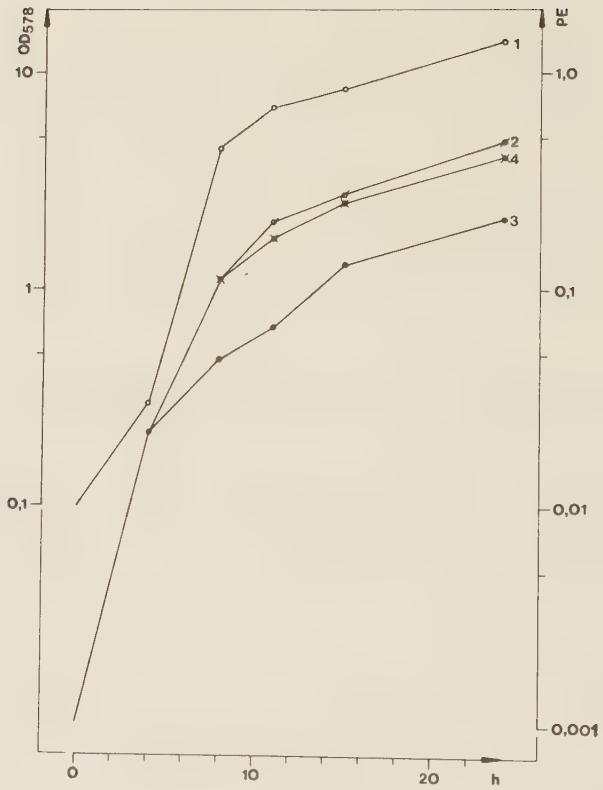

Abb.11 Verlauf der GPA von PA-1 bei 1 µg TC/ml

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum als OD bei 578 nm; GPA in PE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Kurve 1: Wachstum mit bzw. ohne TC; Kurve 2: GPA ohne TC; Kurve 3: GPA bei Zugabe von 1 µg TC/ml nach 4 Stunden; Kurve 4: GPA bei Zugabe von 1 µg TC/ml nach 8 Stunden. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s < 10\%$).

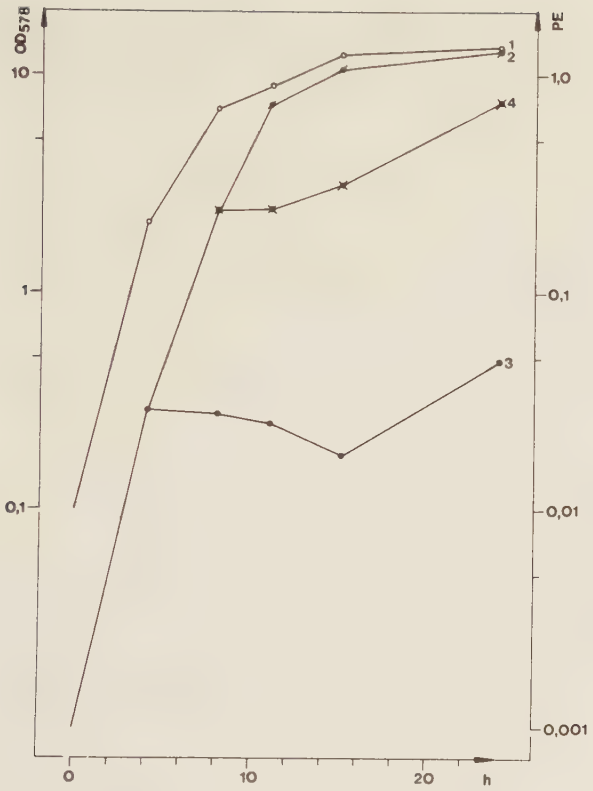

Abb.12 Verlauf der GPA von PA-11 bei 4 µg TC/ml

Ordinate im logarithmischen Maßstab: Wachstum als OD bei 578 nm; GPA in PE. Abszisse im linearen Maßstab: Stunden in h. Kurve 1: Wachstum mit bzw. ohne TC; Kurve 2: GPA ohne TC; Kurve 3: GPA bei Zugabe von 4 µg TC/ml nach 4 Stunden; Kurve 4: GPA bei Zugabe von 4 µg TC/ml nach 8 Stunden. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leq 10\%$).

3.8 Einfluß zweier subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen auf die gesamte proteolytische Aktivität, die Lipase- und die Phospholipase C-Aktivität

Bei 12 PA-Stämmen wurde der Einfluß von 1 µg und 4 µg TC/ml auf die GPA, die Li- und PLC-Aktivität in Abhängigkeit vom Wachstum untersucht (s. 2.7.6).
Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3 bis 6 und den Abbildungen 13 bis 16 zusammengefaßt.
TC wurde den Hauptkulturen zu Beginn der Messungen zugegeben, da es - wie in 3.7. festgestellt - seine optimale Wirkung in der frühen logarithmischen Wachstumsphase hat.

Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Ergebnisse der Kulturen im TSB-Medium. In der Tabelle 3 sind die Werte der Bakteriendichten als OD bei 578 nm, der GPA in PE und der Li-Aktivität in LE nach 12, 24 und 48 Stunden Wachstum für die Kulturen ohne, mit 1 µg und mit 4 µg TC/ml zusammengefaßt. In der Tabelle 4 sind die Werte mit TC aus der Tabelle 3, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC, dargestellt.
Die Tabellen 5 und 6 zeigen die Ergebnisse der Kulturen im phosphatfreien Medium. In der Tabelle 5 sind die Werte der Bakteriendichten als OD bei 578 nm und der PLC-Aktivität in PLCE nach 24 und 48 Stunden Wachstum für die Kulturen ohne, mit 1 µg und mit 4 µg TC/ml zusammengefaßt. In der Tabelle 6 sind die Werte mit TC aus der Tabelle 5, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC, dargestellt.
Auf Grund der geringen Bakteriendichten nach 12 Stunden Wachstum im phosphatfreien Medium wurde auf diese Werte verzichtet.
In den Abbildungen 13 und 14 sind die Werte der Bakteriendichten bei 1 µg (1) bzw. 4 µg (2) TC/ml und die der GPA und Li-Aktivität bei 1 µg (3) bzw. 4 µg (4) TC/ml, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC aus-

gedrückt, gegen die Zeit in h aufgetragen. Die Werte stammen aus Tabelle 4.
In der Abbildung 15 sind die Werte der Bakteriendichten bei 1 µg (1) bzw. 4 µg (2) TC/ml und die PLC-Aktivität bei 1 µg (3) bzw. 4 µg (4) TC/ml, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC ausgedrückt, gegen die Zeit in h aufgetragen. Die Werte stammen aus Tabelle 6.
In der Abbildung 16 sind die 24 Stunden-Werte der Bakteriendichten im TSB- und phosphatfreien Medium, der GPA und der Li- und PLC-Aktivität bei 1 µg und 4 µg TC/ml, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC, dargestellt. Die Werte stammen aus den Tabellen 4 und 6.

Für das Wachstum, die GPA und die Li-Aktivität ergab sich folgendes (Tab. 3 und 4 und Abb. 13 und 14):

Bei den Stämmen 6, 8 und 12 fand sich schon bei 1 µg TC/ml eine Hemmung des Wachstums. Bei den Stämmen 3, 4 und 11 wurde das Wachstum bei beiden TC-Konzentrationen kaum beeinflußt. Bei den anderen Stämmen war das Wachstum erst bei 4 µg TC/ml deutlich gehemmt.
Die Hemmung des Wachstums ging bis 24 Stunden wieder zurück, wobei der Rückgang bei 1 µg schneller erfolgte als bei 4 µg TC/ml und nach 48 Stunden nicht mehr vorhanden war.

Die Ergebnisse passen gut zu den ermittelten MHK-Werten (Tab. 1). Die Stämme 3, 4 und 11 hatten mit 250 µg TC/ml die höchsten MHK-Werte. Die Stämme 7, 8, 9 und 10 hatten mittlere MHK-Werte von 120 µg TC/ml und die Stämme 1, 2, 5 und 6 von 60 µg TC/ml. PA-12 hatte mit 30 µg TC/ml den niedrigsten MHK-Wert.

Die GPA in den Kulturen ohne TC-Zugabe ging bei den Stämmen 3, 7, 8 und 10 nach 24 Stunden wieder zurück, stieg bei den Stämmen 5 und 12 von 24 auf 48 Stunden um etwa den Faktor 10 an und blieb bei den anderen

Stämmen ab 24 Stunden konstant.
Höhe und Verlauf der GPA mit TC war bei den einzelnen Stämmen recht unterschiedlich. Die Hemmung der GPA war bei 4 µg TC/ml deutlich stärker ausgeprägt als bei 1 µg TC/ml und ging bei den meisten Stämmen von 24 auf 48 Stunden zurück oder blieb konstant.
Der Verlauf der GPA bei 1 µg TC/ml entsprach - außer bei den Stämmen 1 und 6 - dem Verlauf der GPA ohne TC-Zugabe. Der Verlauf der GPA bei 4 µg TC/ml entsprach bei den Stämmen 2, 3, 4, 5, 9 und 12 dem Verlauf ohne TC, bei den anderen Stämmen stieg die GPA bis 48 Stunden an.

Die Li-Aktivität in den Kulturen ohne TC-Zugabe änderte sich bei den Stämmen 5, 6, 9 und 12 zwischen 24 und 48 Stunden praktisch nicht mehr; bei den Stämmen 3 und 10 stieg sie von 24 auf 48 Stunden an; bei den anderen Stämmen fiel sie nach 24 Stunden wieder ab.
Bei beiden TC-Konzentrationen wurde die Li-Aktivität bei allen Stämmen anfangs mehr oder weniger stark erniedrigt und stieg bis 48 Stunden wieder an.
Die Li-Aktivität war bei 4 µg TC/ml stärker erniedrigt als bei 1 µg TC/ml.
Bei den Stämmen 4, 7, 8, 11 und 12 waren die Werte nach 48 Stunden bei 4 µg höher als bei 1 µg TC/ml. Sie lagen bei beiden TC-Konzentrationen teilweise über den entsprechenden Werten ohne TC.
Der Verlauf der Li-Aktivität bei 1 µg TC/ml entsprach bei den Stämmen 3, 4, 7, 10 und 12 dem Verlauf ohne TC; ihr Verlauf bei 4 µg TC/ml entsprach bei den Stämmen 3, 4, 10 und 12 dem Verlauf ohne TC. Bei den anderen Stämmen stieg die Li-Aktivität bei beiden Konzentrationen bis 48 Stunden an.

Für das Wachstum und die PLC-Aktivität ergab sich folgendes (s. Tab. 5 und 6 und Abb. 15):
Bei den Stämmen 4, 7, 11 und 12 wurde das Wachstum bei

beiden TC-Konzentrationen kaum beeinflußt. Diese Stämme hatten auch die höchsten Wachstumsraten.
Bei den Stämmen 1, 3, 8 und 10 wurde das Wachstum erst bei 4 µg TC/ml deutlich erniedrigt.
Bei den Stämmen 5, 6 und 9 wurde das Wachstum von beiden TC-Konzentrationen beeinflußt, wobei die Hemmung bei 4 µg TC/ml größer war als bei 1 µg TC/ml. Diese Stämme hatten auch mit die niedrigsten Wachstumsraten. Das Wachstum stieg nach anfänglicher Hemmung bis 48 Stunden wieder an, hier war praktisch keine Hemmung mehr vorhanden.
Bei einigen Stämmen treten unter TC Unterschiede zwischen dem Wachstum im TSB- und im phosphatfreien Medium auf. Das hängt wohl mit den unterschiedlichen Wachstumseigenschaften dieser Stämme in den beiden Medien zusammen. Die TC-Empfindlichkeit eines Stammes hängt auch von den äußeren Wachstumsbedingungen ab.

Die PLC-Aktivität in den Kulturen ohne TC-Zugabe stieg - außer bei PA-7 - von 24 bis 48 Stunden an.
Die PLC-Aktivität war bei 4 µg stärker gehemmt als bei 1 µg TC/ml.
Die PLC-Aktivität stieg bei beiden TC-Konzentrationen bie 48 Stunden an, wobei sie meistens unter den entsprechenden Werten ohne TC lag.

Im allgemeinen ließen sich bei Stämmen mit niedrigen Enzymaktivitäten diese durch TC stärker hemmen als bei Stämmen mit hohen Enzymaktivitäten.
Es scheint weder zwischen der Hemmung des Wachstums und der Hemmung der Enzymaktivitäten, noch zwischen der Hemmung der einzelnen Enzymaktivitäten untereinander ein Zusammenhang zu bestehen.

In der Abbildung 16 sind die Werte für die Hemmung des Wachstums und die Hemmung der Enzymaktivitäten bei beiden TC-Konzentrationen nach 24 Stunden Wachstum zusam-

Tab.3 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum, GPA und Li

PA-Stamm	TC (µg/ml)	OD 578 nm 12 h	24 h	48 h	GPA (PE) 12 h	24 h	48 h	Li (10^{-5} LE) 12 h	24 h	48 h
1	0	10,0	13,5	6,5	0,15	0,48	0,46	10,5	25,7	9,5
	1	9,0	13,0	5,5	0,03	0,23	0,34	-	3,8	19,5
	4	3,0	6,0	6,0	0,01	0,05	0,20	-	-	13,8
2	0	7,5	11,5	3,5	0,22	0,50	0,51	13,3	31,4	10,5
	1	7,5	10,9	3,6	0,19	0,40	0,49	-	1,0	15,2
	4	5,0	7,5	3,5	0,04	0,16	0,27	-	-	14,3
3	0	8,5	17,0	8,5	0,03	2,31	0,42	0,5	11,4	30,5
	1	9,0	15,5	8,0	0,02	0,74	0,25	-	3,8	29,5
	4	8,5	16,0	9,0	0,02	0,28	0,07	-	-	30,0
4	0	4,5	12,0	1,4	0,49	0,64	0,73	4,0	14,8	3,9
	1	4,5	10,7	1,3	0,28	0,57	0,58	-	10,5	4,8
	4	4,5	11,0	1,5	0,15	0,21	0,19	-	8,6	8,0
5	0	8,0	15,0	1,9	0,04	0,40	4,21	9,5	14,8	16,2
	1	8,5	14,0	2,0	0,02	0,27	2,89	-	13,4	17,1
	4	5,5	10,0	1,5	0,02	0,13	0,60	-	2,9	10,0
6	0	15,0	22,5	2,4	2,15	3,29	3,35	3,8	12,9	14,2
	1	9,5	19,5	2,1	1,07	2,01	3,06	-	11,3	11,4
	4	3,5	12,0	2,5	0,19	0,39	2,37	-	-	4,8
7	0	2,5	15,5	7,0	0,14	2,23	1,98	12,8	33,3	19,0
	1	2,6	14,0	6,5	0,15	2,15	1,98	7,1	20,9	15,6
	4	1,9	15,0	6,5	0,02	0,38	0,78	-	3,8	21,5
8	0	0,9	13,5	10,0	0,04	1,82	1,32	13,3	41,8	19,0
	1	0,6	12,0	9,5	0,02	1,73	1,26	5,2	11,3	15,2
	4	0,7	14,0	9,0	0,01	0,32	0,53	-	7,6	17,1
9	0	5,5	14,5	8,5	0,02	0,29	0,31	22,8	76,0	76,0
	1	4,8	15,5	8,5	0,02	0,17	0,19	17,1	53,6	68,5
	4	1,9	7,5	9,0	0,01	0,11	0,15	5,5	26,0	57,0
10	0	1,5	15,5	6,6	0,09	3,14	1,98	23,8	38,0	82,5
	1	1,3	14,5	6,2	0,08	2,15	1,65	-	32,3	61,7
	4	0,8	13,0	6,0	0,02	0,40	0,68	-	-	45,6
11	0	7,5	13,5	3,5	0,65	1,38	1,53	20,9	45,6	28,5
	1	8,0	13,0	3,6	0,37	1,28	1,29	-	15,2	22,8
	4	7,6	12,5	3,5	0,02	0,07	0,58	-	8,6	23,8
12	0	5,5	18,0	7,5	0,04	0,20	2,56	15,2	55,6	47,0
	1	1,8	15,0	8,0	0,01	0,08	1,82	3,8	25,6	29,5
	4	1,4	11,5	8,0	0,01	0,01	0,99	2,8	20,8	32,2

Einfluß von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml auf das Wachstum (als OD bei 578 nm), die GPA (in PE) und Li (in LE) von 12 PA-Stämmen in TSB-Medium. Werte mit und ohne TC nach 12, 24 und 48 Stunden. Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leq 5\%$).

Tab.4 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum, GPA und Li

PA-Stamm	TC (µg/ml)	OD 578 nm 12 h	OD 578 nm 24 h	OD 578 nm 48 h	GPA (PE) 12 h	GPA (PE) 24 h	GPA (PE) 48 h	Li (10^{-4} LE) 12 h	Li (10^{-4} LE) 24 h	Li (10^{-4} LE) 48 h
1	1	90	86	85	20	44	74	-	17	205
	4	30	44	92	7	10	44	-	-	145
2	1	100	95	103	86	40	86	-	3	145
	4	67	65	100	18	32	53	-	-	136
3	1	106	91	94	67	32	60	-	33	97
	4	100	94	106	67	12	17	-	-	40
4	1	100	89	93	57	69	80	-	71	123
	4	100	92	107	31	33	26	-	58	205
5	1	106	93	105	50	58	69	-	91	107
	4	59	68	79	50	33	14	-	20	62
6	1	63	87	86	50	61	91	-	86	80
	4	23	53	104	9	12	71	-	-	34
7	1	104	90	93	107	95	100	56	63	82
	4	76	97	93	14	17	39	-	11	113
8	1	67	89	95	50	95	46	39	27	81
	4	78	104	90	25	18	40	-	18	90
9	1	87	107	100	100	59	61	45	71	90
	4	35	52	106	50	38	48	24	34	75
10	1	87	94	94	89	69	83	-	85	75
	4	53	84	91	22	13	34	-	-	55
11	1	107	96	103	57	93	64	-	33	80
	4	101	93	100	3	4	38	-	19	84
12	1	33	79	107	25	40	71	25	42	73
	4	25	61	107	25	5	35	10	32	69

Einfluß von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml auf das Wachstum, die GPA und Li von 12 PA-Stämmen in TSB-Medium. Werte unter TC-Einfluß aus Tab.3 nach 12, 24 und 48 Stunden in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC.

Tab. 5 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum und PLC

PA-Stamm	TC (µg/ml)	10^{-2} OD 578 nm 24 h	48 h	PLC (PLCE) 24 h	48 h
1	0	10,5	14,0	1,59	2,14
	1	11,0	14,0	0,95	1,31
	4	3,8	5,8	0,17	0,53
3	0	14,0	13,1	1,26	2,37
	1	14,0	12,3	1,07	1,22
	4	6,1	11,6	0,12	1,14
4	0	16,8	15,0	0,85	1,67
	1	17,5	16,5	1,00	1,87
	4	15,7	15,5	0,26	0,88
5	0	8,5	9,0	1,50	2,06
	1	6,0	10,0	0,97	2,38
	4	4,0	9,5	0,48	1,54
6	0	7,5	11,3	2,50	3,80
	1	4,1	10,9	1,40	3,58
	4	3,0	11,0	0,36	2,40
7	0	18,8	12,0	3,80	3,60
	1	17,9	11,6	2,10	3,58
	4	16,8	12,0	2,00	3,45
8	0	10,5	14,0	2,10	2,90
	1	11,0	15,0	2,29	3,00
	4	8,4	13,4	0,97	2,45
9	0	9,0	11,7	0,80	1,50
	1	7,9	10,9	0,20	1,50
	4	5,0	10,1	0,10	0,50
10	0	9,5	12,5	1,10	1,20
	1	9,5	12,1	0,55	1,30
	4	5,8	11,6	0,28	1,00
11	0	11,5	19,7	1,50	2,50
	1	10,2	20,5	1,02	2,71
	4	11,6	19,1	0,84	2,46
12	0	17,0	12,5	3,34	4,19
	1	17,6	13,0	1,29	1,41
	4	16,0	14,5	0,75	1,37

Einfluß von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml auf das Wachstum (als OD bei 578 nm) und die PLC (in PLCE) von 11 PA-Stämmen in phosphatfreiem Medium. Werte mit und ohne TC nach 24 und 48 Stunden. Mittelwerte aus je 4 Messungen (s $\leq$ 5%).

Tab.6 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum und PLC

PA-Stamm	TC (µg/ml)	10^{-2} OD 578 nm 24 h	48 h	PLC (PLCE) 24 h	48 h
1	1 4	105 36	100 41	60 11	61 25
3	1 4	100 44	94 89	85 10	52 48
4	1 4	104 94	110 103	118 31	112 53
5	1 4	71 47	111 106	65 32	116 75
6	1 4	55 40	97 97	56 14	94 63
7	1 4	95 89	97 100	55 53	99 96
8	1 4	105 80	107 96	109 46	103 85
9	1 4	88 56	93 86	25 13	100 33
10	1 4	100 61	97 93	50 26	108 83
11	1 4	89 101	104 97	68 56	108 98
12	1 4	104 94	104 115	39 23	34 33

Einfluß von 1 µg bzw. 4 µg TC/ml auf das Wachstum und die PLC von 11 PA-Stämmen in phosphatfreiem Medium. Werte unter TC-Einfluß aus Tab.5 nach 24 und 48 Stunden in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC.

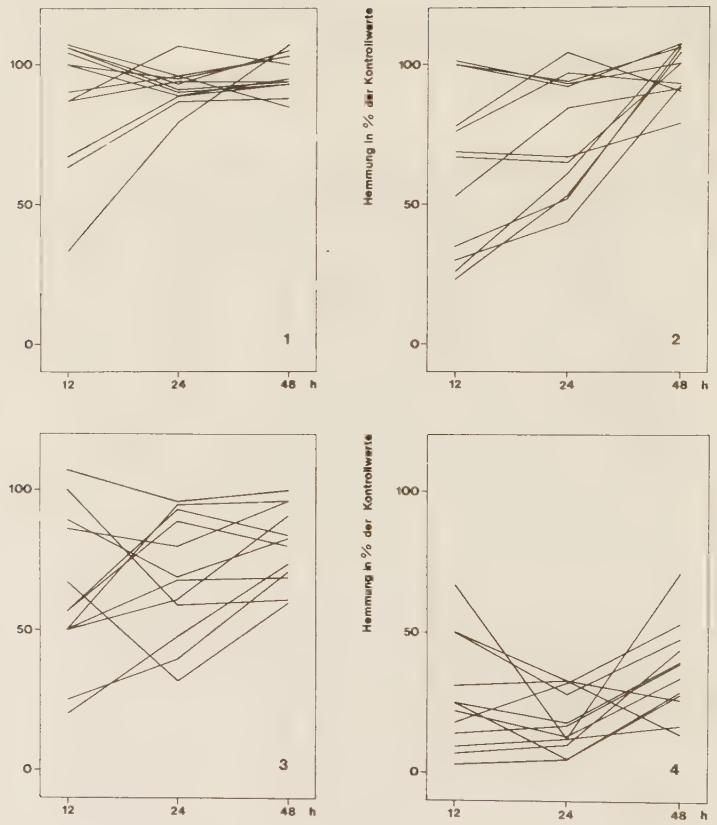

Abb.13 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum und GPA von 12 PA-Stämmen

Ordinate: Wachstum bzw. GPA unter TC-Einfluß, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC. Abszisse: Stunden in h. 1: Wachstum bei 1 µg TC/ml; 2: Wachstum bei 4 µg TC/ml; 3: GPA bei 1 µg TC/ml; 4: GPA bei 4 µg TC/ml. Werte stammen aus Tab.4.

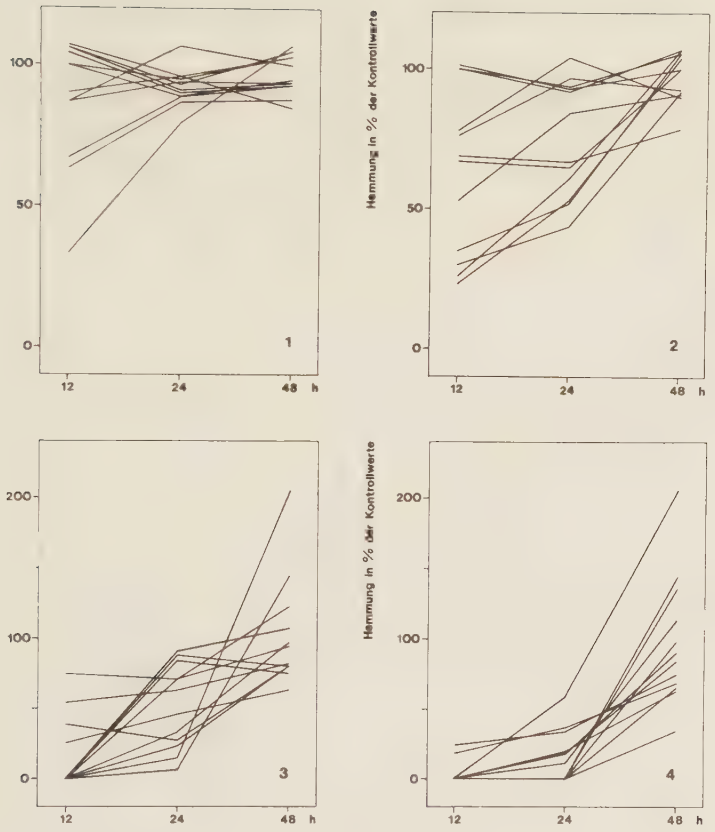

Abb.14 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum und Li von 12 PA-Stämmen

Ordinate: Wachstum bzw. Li unter TC-Einfluß, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC. Abszisse: Stunden in h. 1: Wachstum bei 1 µg TC/ml; 2: Wachstum bei 4 µg TC/ml; 3: Li bei 1 µg TC/ml; 4: Li bei 4 µg TC/ml. Werte stammen aus Tab.4.

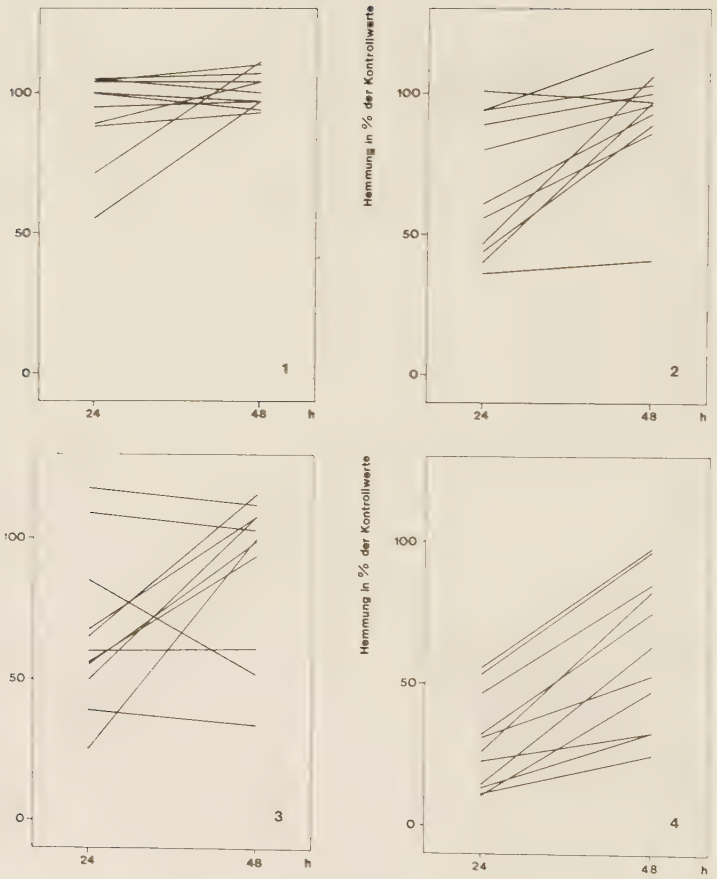

Abb.15 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum und PLC von 11 PA-Stämmen

Ordinate: Wachstum bzw. PLC unter TC-Einfluß, jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC. Abszisse: Stunden in h. 1: Wachstum bei 1 µg TC/ml; 2: Wachstum bei 4 µg TC/ml; 3: PLC bei 1 µg TC/ml; 4: PLC bei 4 µg TC/ml. Werte stammen aus Tab.6.

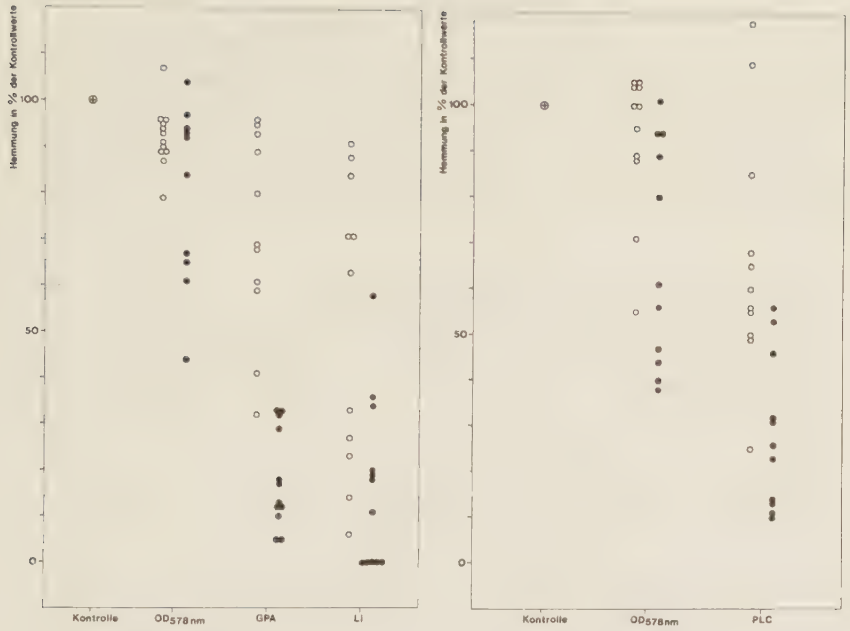

Abb.16 Einfluß zweier subinhibitorischer TC-Konzentrationen auf Wachstum, GPA, Li und PLC

Einfluß von 1 µg (o) bzw. 4 µg (●) TC/ml auf das Wachstum, die GPA und Li von 12 PA-Stämmen in TSB-Medium bzw. auf das Wachstum und die PLC von 11 PA-Stämmen in phosphatfreiem Medium. Werte unter TC-Einfluß aus Tab.4 und 6 nach 24 Stunden jeweils in % der entsprechenden Kontrollwerte ohne TC.

mengefaßt. Die Enzymaktivitäten sind bei beiden TC-Konzentrationen stärker gehemmt als das Wachstum. Diese selektive Hemmung ist signifikant zum Niveau $\alpha = 0{,}05$ im WILCOXON-Differenztest (s. Anhang). Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% hemmt TC bei PA die Enzymaktivitäten stärker als das Wachstum.

3.9 Tetracyclineinfluß auf Enzyme

Es sollte die Frage geklärt werden, ob TC auch auf die Aktivität bereits gebildeter und sezernierter Enzyme einwirkt.

Für die Untersuchung der Proteasen und der Li wurde KÜ benutzt, der nach 24 Stunden Wachstum von PA-11 in TSB-Medium gewonnen wurde. Für die Untersuchung der PLC wurde KÜ verwendet, der nach 39 Stunden Wachstum des gleichen Stammes in phosphatfreiem Medium gewonnen wurde. Die Proben dafür stammen aus der in 2.7.2 beschriebenen Untersuchung.
Das TC wurde dem KÜ so zugegeben, daß eine Endkonzentration von 1 mg TC/ml vorlag. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Enzymaktivitäten im KÜ vor und nach TC-Zugabe wurden wie beschrieben ermittelt (s. 2.5.1, 2.5.3 und 2.5.4) und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.

Zwischen den Werten vor und nach TC-Zugabe besteht kein Unterschied.

PA-11 produziert mehr Ela als AP (s. Tab. 1). Ela reagiert im Azocaseintest sehr viel aktiver als AP (s. 2.5.1), so daß die Ela für die GPA von PA-11 ausschlaggebend ist. Aus den GPA-Werten in der Tabelle 7 ergibt sich zwar sicher, daß TC die Ela-Aktivität nicht beein-

Tab. 7 TC-Einfluß auf Enzyme

	ohne TC	1 mg TC/ml
GPA (PE)	1,39	1,41
Li (10^{-5} LE)	45,2o	43,7o
PLC (PLCE)	3,2o	3,1o

Enzymaktivitäten im KÜ vor und nach Inkubation mit 1 mg TC/ml. Der KÜ wurde nach 24 Stunden Wachstum von PA-11 in TSB-Medium für GPA und Li bzw. in phosphatfreiem Medium für PLC gewonnen.
GPA in PE, Li in LE und PLC in PLCE.
Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leq 5\%$).

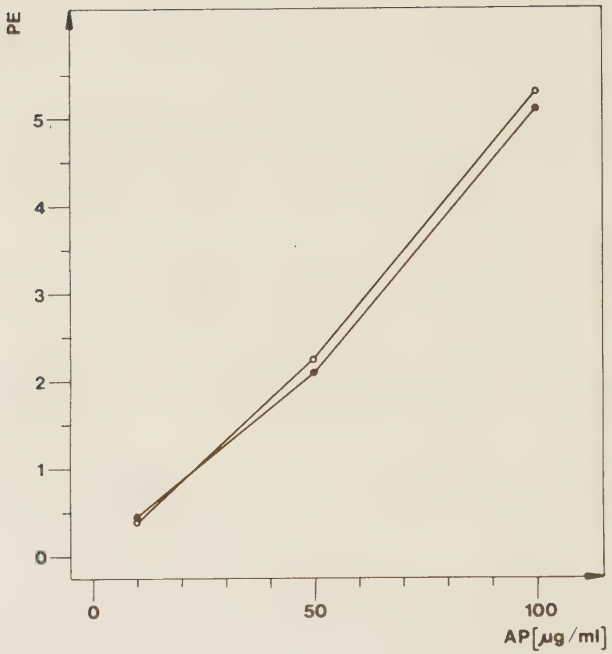

Abb.17 Einfluß von 1 mg TC/ml auf gereinigte AP

Die Aktivitäten verschiedener AP-Lösungen in PBS wurden vor (■) und nach (o) Inkubation mit 1 mg TC/ml gemessen. Ordinate: AP-Aktivität in PE. Abszisse: AP-Menge in µg/ml. Mittelwerte aus je 4 Messungen (s ≤5%).

flußt, Aktivitätsänderungen der AP hätten jedoch unbemerkt bleiben können, deshalb wurde der Einfluß von TC auf gereinigte AP untersucht (s. 2.6.6).
In der Abbildung 17 ist die Proteaseaktivität in PE gegen die AP-Menge in µg/ml aufgetragen. Die schwarzen Punkte zeigen die Kontrollwerte, die weißen Punkte die AP-Aktivität bei 1 mg TC/ml.
Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.

Auch hier waren die Werte praktisch gleich.
TC scheint auf gebildete Enzyme keinen Einfluß zu haben.

3.10 Wirkungsmechanismus von Tetracyclin

Der Einfluß von 4 µg TC/ml auf die Ela-Produktion von PA-11 wurde untersucht (s. 2.6.5). Es sollte geklärt werden, ob TC nur die Syntheserate vermindert, oder ob auch die Aktivität der unter TC-Einfluß gebildeten Proteasen verändert wird.

Das Verhältnis zwischen der Proteaseaktivität in Kulturen mit bzw. ohne TC und der Proteasemenge in Kulturen mit bzw. ohne TC könnte darüber Aufschluß geben. Vermindert TC nicht nur die Menge, sondern auch die Aktivität der neugebildeten Protease, wäre die Proteaseaktivität stärker reduziert als sie Proteasemenge. Trifft dieses nicht zu, wäre die Proteaseaktivität und die Proteasemenge im gleichen Ausmaß reduziert. Der Azocaseintest mißt die Aktivität beider Proteasen. Da die Ela aber um etwa den Faktor 10 aktiver reagiert als die AP (s. 2.5.1), ist bei einem Stamm mit hoher Ela-Produktion wie bei PA-11 der Anteil der AP an der GPA zu vernachlässigen.

In der Tabelle 8 sind die Ela-Mengen in µg/ml und die GPAs in PE, nach 12 Stunden Wachstum gemessen, für die

Tab. 8 Einfluß von 4 µg TC/ml auf die Ela-Produktion von PA-11

	Ela (µg/ml)	GPA (PE)
Ø TC	31,5	0,58
4 µg TC/ml	0,5	0,01

	Ela	GPA
Reduktions-faktor	63	58

Vergleich der Ela-Menge in µg/ml und der GPA in PE mit bzw. ohne TC.
Der Reduktionsfaktor entspricht dem Quotienten aus dem Wert ohne TC und dem Wert bei 4 µg TC/ml.
Mittelwerte aus je 4 Messungen ($s \leqslant 5\%$)

Kulturen ohne TC und mit 4 µg TC/ml zusammengefaßt. Dargestellt sind Mittelwerte aus je 4 Messungen.

Die Ela-Menge wurde um den Faktor 63 reduziert, die GPA um den Faktor 58. Sowohl die Menge als auch die Aktivität der Ela wurde damit praktisch im gleichen Ausmaß reduziert.
TC scheint also nur die Syntheserate von Ela zu vermindern und keinen Einfluß auf die Aktivität der neugebildeten Ela zu haben.

D I S K U S S I O N

Pseudomonas aeruginosa (PA) verfügt wie viele Mikroorganismen über extracelluläre Toxine und Enzyme, die auch als Exoenzyme bezeichnet werden. Diese bauen höhermolekulare Substrate, die die Zelle nicht direkt verwerten kann, zu niedermolekularen ab, welche dann zur Weiterverwendung in die Zelle eingeschleust werden können.

Enzyme, die im Kulturüberstand (KÜ) gefunden werden, können verschiedene Ursprünge haben:
Es können intracelluläre Enzyme sein, die durch erhöhte Durchlässigkeit der Zellwand oder durch Zellyse freigesetzt werden. Diese erscheinen erst in der Absterbephase in nennenswerten Mengen im KÜ.
Es kann sich dabei auch um Exoenzyme handeln, die von wachsenden Zellen synthetisiert und ausgeschleust werden. Die höchste Produktions- und Sekretionsrate von Exoenzymen findet man typischer Weise gegen Ende der logarithmischen oder am Anfang der stationären Wachstumsphase (22;60). Allerdings werden von manchen gramnegativen Bakterien einige Exoenzyme (z.B. eine von den meisten produzierte alkalische Phophatase) im periplasmatischen Raum zwischen der Zytoplasmamembran und der äußeren Zellwand ganz oder teilweise zurückgehalten. Diese erscheinen dann auch erst in der Absterbephase im KÜ (22;60;71).

Über den Regulationsmechanismus für Synthese und Sekretion von Exoenzymen ist wenig bekannt. Plasmide spielen dabei wohl eine Rolle, denn die genetische Information für die Synthese einiger Exoenzyme ist bei einigen Bakterien auf ihnen lokalisiert (83;4). PA-Stämme können bei längerer Lagerung ihre Fähigkeit, Elastase zu produzieren, ganz oder teilweise verlieren (49). Das könnte mit einem Verlust des dafür codierenden Plasmids

zusammenhängen. Viele Autoren nehmen einen gemeinsamen genetischen Regulationsmechanismus für alle Enzyme an, dies trifft wahrscheinlich auch bei PA zu (2).
In vielen Fällen wurde ein Mechanismus analog der Katabolit-Repression bei intracellulären Enzymen beobachtet (8;78;80;83). Darunter versteht man die Unterdrückung anderer katabolischer Reaktionswege zugunsten eines Vorzugssubstrates, solange dieses ausreichend zur Verfügung steht.
Zum Regulationsmechanismus für Proteasen gibt es widersprüchliche Ergebnisse, doch deuten auch hier einige Beobachtungen auf eine Katabolitrepression (9;78;80; 83). Bei der Regulation der Phospholipase C (PLC) von PA scheint dagegen ein Mechanismus analog der Endprodukt-Repression vorzuliegen (79). Dabei hemmt das Endprodukt eines katabolischen Reaktionsweges die dazugehörenden Enzyme.

Der Verlauf einiger Enzyme von PA, an den Stämmen 1 und 11 untersucht, bestätigt ihren Exoenzymcharakter (Abb.2 bis 5). Auch die Ergebnisse bei den anderem Stämmen sprechen dafür (Tab. 3 bis 6 und Abb. 13 bis 16).
Der Verlauf der Werte für die Proteasen bzw. die Lipase bei den Stämmen 5 und 12 bzw. 3 und 10 sprechen allerdings dagegen (Tab. 3 und 4). Vielleicht werden diese Exoenzyme bei diesen Stämmen weitgehend im periplasmatischen Raum zurückgehalten und erst in der Absterbephase freigesetzt. Dagegen stünden allerdings Beobachtungen anderer Autoren, die bei PA nur sehr geringe Mengen an Proteasen und PLC im periplasmatischen Raum finden konnten (74;79). Möglicherweise sind hier intracelluläre Enzyme, die ebenfalls mit den Testsubstraten reagieren können, für die hohen Werte nach 48 Stunden verantwortlich.
Das könnte auch erklären, warum bei einigen Stämmen die Enzymaktivitäten nach Erreichen ihres Maximums nach 24 Stunden bis 48 Stunden konstant bleiben, bei einigen wieder abnehmen. Hier könnte aber auch eine unterschiedliche

Abbaugeschwindigkeit der Enzyme eine Rolle spielen. Nach Beobachtungen einiger Autoren hemmt Tetracyclin (TC) selektiv die Protease- und PLC-Synthese von PA (57;74;79). Auch eine selektive Hemmung der Lipase von Staphylococcus aureus durch TC konnte beobachtet werden (43).

Hier konnte ebenfalls eine selektive Hemmbarkeit der Proteasesynthese durch subinhibitorische TC-Konzentrationen gezeigt werden (Abb. 6 und 7).
Bei den PA-Stämmen 1 und 11 führten schon kleinste TC-Konzentrationen, die auf das Wachstum keinen Einfluß hatten, zu einer deutlichen Erniedrigung der Proteasesynthese. Auch bei höheren TC-Konzentrationen blieb diese Synthese stärker gehemmt als das Wachstum.
Bei beiden Stämmen zeigte sich, daß ab einer bestimmten TC-Konzentration die Hemmung der Proteasesynthese konstant blieb und verglichen mit der Wachstumshemmung sogar zurückging. Möglicherweise kann die Exoenzymsynthese nur bis zu einem bestimmten Prozentsatz unterdrückt werden, so daß immer eine Restproduktion bleibt.
In den Abbildungen 9 und 10 ist zu beobachten, daß die Hemmung der Proteasesynthese nach 10 Stunden größer ist als nach 24 Stunden. da eine kurzfristige Anpassung der Zellen an TC wohl ausgeschlossen werden kann, ließe sich dieses mit dem konzentrationsabhängigen Wirkungsverlust des TC erklären (s. 3.4 und 3.5). Es ist bekannt, daß TC, in Lösung gebracht, schnell zerfällt. Außerdem kann TC mit Ca^{2+}, Mg^{2+} und anderen zweiwertigen Kationen, die ebenfalls im Medium vorhanden sind, Chelatkomplexe bilden.
Wird TC in der frühen logarithmischen Wachstumsphase zugegeben, ist seine Wirkung stärker und hält länger an, als bei späterer Zugabe. Wie stark die Proteasesynthese gehemmt wird, hängt außerdem von der TC-Konzentration ab (s. 3.6 und 3.7).
Neben dem konzentrationsabhängigen Wirkungsverlust des

TC scheint also auch das Verhältnis zwischen TC-Menge und Bakteriendichte von Bedeutung zu sein.

Bei den anderen Stämmen fanden sich gleiche Ergebnisse (Tab. 3 bis 6 und Abb. 13 bis 16). Die Proteasen, Li und PLC ließen sich bei allen Stämmen mit subinhibitorischen TC-Konzentrationen signifikant selektiv hemmen (s. 3.8). Zwischen der Hemmbarkeit des Wachstums und der Hemmbarkeit der Enzymproduktion durch TC scheint kein Zusammenhang zu bestehen. Bei Stämmen mit hohen MHK-Werten waren diese schon bei niedrigen TC-Konzentrationen hemmbar - und umgekehrt. Auch zwischen der Hemmbarkeit der einzelnen Enzyme untereinander besteht wohl kein Zusammenhang (s. 3.7). Das bestätigen auch Beobachtungen anderer Autoren, daß Proteinbiosynthesehemmer, die am Ribosom angreifen, die Synthese verschiedener Exoenzyme bei einem Stamm unterschiedlich beeinflussen können (19;35;83). Die Interpretation der 48 Stundenwerte der GPA und Li ist schwierig. Die Bakterienkonzentrationen sind sehr viel geringer als nach 24 Stunden, die Zellen befinden sich in der Absterbephase. Eine Neusynthese von Exoenzymen kann wohl ausgeschlossen werden. Trotzdem steigen die Enzymaktivitäten zwischen 24 und 48 Stunden bei vielen Stämmen unter TC-Einfluß an, vor allem bei 4 µg TC/ml. Besonders ausgeprägt ist das bei der Li, wo die Werte unter TC-Einflußteilweise höher als die ohne TC sind. Eine reversible Aktivitätsverminderung der Enzyme durch TC liegt wohl nicht vor (s. 3.9). Das wäre vor allem bei den Proteasen vorstellbar, da beide Metalloenzyme sind, wobei bei AP Ca^{2+} und bei Ela Zn^{2+} eine Rolle spielt (46;48), und TC ja mit zweiwertigen Kationen reagieren kann. Auch eine Aktivitätsverminderung der unter TC-Einfluß synthetisierten Enzyme scheint nicht vorzuliegen (s. 3.10).
Es könnten wieder, wie bereits diskutiert, intracelluläre Enzyme verantwortlich sein. Es bleibt dann aber die Frage offen, warum bei der Li in einigen Fällen die

Werte bei den TC-haltigen Kulturen höher als bei den TC-freien sind. Wahrscheinlicher ist hier wohl, daß TC auch die Sekretion der Enzyme unterschiedlich hemmt, so daß sich diese intracellulär ansammeln und erst in der Absterbephase im KÜ erscheinen.
Andere Autoren konnten allerdings eine Sekretionshemmung durch TC bei den Proteasen und der PLC nicht beobachten (74;79). Für die Li von PA liegen keine derartigen Beobachtungen vor.

Wie könnte nun die selektive Wirkung von TC auf die Exoenzymsynthese zu erklären sein?
Nach heutigen Vorstellungen findet die Synthese von Exoenzymen an membrangebundenen Ribosomen statt, die entstehenden Enzyme werden sofort durch die Membran ausgeschleust. Die Synthese wird durch eine im Überschuß vorhandene Menge von mRNA aufrechterhalten (3;22).
Es gibt viele indirekte Hinweise dafür, daß die Synthese von Exoenzymen an membrangebundenen Ribosomen stattfindet (20;24;40;72;73;74;78;79;84). Für die alkalische Phosphatase von Escherichia coli konnte dies direkt gezeigt werden (4). Auch die Beobachtung, daß einige Proteinbiosynthesehemmer, die am Ribosom angreifen, nicht nur die Synthese, sondern auch die Sekretion von Exoenzymen hemmen können, deutet auf eine enge räumliche und funktionelle Koppelung beider Prozesse hin (20;22;60). Während der Sekretionsphase von Exoenzymen akkumuliert mRNA intracellulär (20;22;79). Bei einigen Stämmen fand man eine weiterlaufende Synthese und Sekretion von Exoenzymen auch dann, wenn die mRNA-Synthese durch RNA-Polymerasehemmer unterdrückt wurde (3;23;25;70;78;79;83).
Auch für PA scheint dieses Modell zuzutreffen (79;84).
Die heutigen Vorstellungen über die Aufnahme von TC in gramnegative Zellen und die Resistenzmechanismen gramnegativer Zellen gegen TC wurden von CHOPRA und HOWE und neuerdings von FISCHER und BRAUN zusammenfassend dargestellt (5;18). Danach beruht die Resistenz anscheinend

vor allem auf der Induktion eines hochwirksamen Transportsystems, das TC schnell aus der Zelle entfernt, ehe es gefährlich akkumulieren kann (82).
TC kann also nach wie vor die Membranen passieren, allerdings nur in geringen Mengen, und es wird sofort wieder aus der Zelle transportiert.
Damit könnte auch die Wahrscheinlichkeit höher sein, daß es eher auf membrangebundene als auf frei im Cytoplasma schwimmende Ribosomen wirkt. Möglicherweise läßt sich so die selektive Wirkung des TC auf die Exoenzymsynthese erklären.
In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß Chloramphenicol sowohl bei PA als auch bei Staphylococcus aureus keine selektive Wirkung auf die Exoenzymsynthese zu haben scheint (20;74). Chloramphenicol greift ebenfalls am Ribosom an und hat fast den gleichen Wirkungsmechanismus wie TC (53), resistente Keime bauen aber Chloramphenicol enzymatisch ab. Im Gegensatz zu TC bleibt Chloramphenicol also nicht intakt. Bei subinhibitorischen Konzentrationen dürfte kaum aktives Chloramphenicol in die Zelle gelangen, womit auch keine selektive Wirkung auf die Exoenzymsynthese möglich wäre.

ZUSAMMENFASSUNG

Pseudomonas aeruginosa (PA) hat als Hospitalismuskeim große Bedeutung erlangt. PA produziert und sezerniert extracelluläre Toxine und Enzyme, die für seine Pathogenität entscheidend sind, u.a. auch eine alkalische Protease (AP), eine Elastase (Ela), eine Phospholipase C (PLC) und eine Lipase (Li).

Die Therapie von PA-Infektionen ist schwierig. Eine antibiotische Therapie, die eine Elimination des Keimes anstrebt, hat oft keinen Erfolg. Eine andere Therapiemöglichkeit könnte darin liegen, zumindest die Produktion der für die Pathogenität von PA mit verantwortlichen Virulenzfaktoren zu erniedrigen. Dieser Mechanismus wird z.B. für die Wirkung von Tetracyclin (TC) in der Aknetherapie diskutiert.

Einige Autoren fanden eine selektive Hemmung der Protease- und PLC-Synthese durch subinhibitorische TC-Konzentrationen. Auch in dieser Arbeit ließ sich eine signifikante selektive Hemmung der Synthese der AP, Ela, Li und PLC durch subinhibitorische TC-Konzentrationen bei 12 PA-Stämmen zeigen.
Bei 1 µg TC/ml war die Produktion aller untersuchten Enzyme bei den meisten Stämmen, bei 4 µg TC/ml bei allen Stämmen deutlich gehemmt. Weder zwischen der Hemmbarkeit des PA-Wachstums und der Hemmbarkeit der Enzymproduktionen, noch zwischen der Hemmbarkeit der Enzymproduktionen untereinander scheint ein Zusammenhang zu bestehen.
Unter TC-Einfluß produzierte Enzyme scheinen nicht in ihrer Aktivität vermindert zu sein. Auch auf bereits gebildete Enzyme scheint TC keinen Einfluß zu haben. Also hemmt TC wohl nur die Enzymsynthese.
Möglicherweise hemmt TC auch die Enzymsekretion; zu-

mindest bei der Li sprechen einige Beobachtungen dafür. Für die Proteasen und die PLC würde das allerdings im Widerspruch zu Beobachtungen anderer Autoren stehen.

Es wurde versucht, die selektive Wirkung des TC auf die Exoenzymsynthese von PA in Gegenüberstellung zu den Vorstellungen über Synthese und Sekretion von Exoenzymen und den Resistenzmechanismen gramnegativer Zellen gegen TC zu klären.

A N H A N G

Im Abschnitt 3.8 wurde der Einfluß zweier subinhibitorischer Tetracyclin(TC)-Konzentrationen auf die gesamte proteolytische Aktivität, die Lipase- und Phospholipase C-Aktivität von 12 Pseudomonas aeruginosa-Stämmen untersucht. Die 24 Stunden-Werte für Wachstum und Enzymaktivitäten unter TC-Einfluß sind in der Abbildung 16 dargestellt. Es sollte mit einem Signifikanztest geprüft werden, ob zwischen der Hemmung der Enzymaktivitäten und der Hemmung des Wachstums Unterschiede bestehen oder nicht.

Ein Signifikanztest ist ein Verfahren, auf Grund von Untersuchungsergebnissen zwischen alternativen Hypothesen zu entscheiden und anzugeben, wie sicher diese Entscheidung ist. Allgemein formuliert man als Nullhypothese H_0 die zu wiederlegende Hypothese, bei deren Verwerfung man sich nur mit einer sehr kleinen Wahrscheinlichkeit α irren darf. Als Entscheidungskriterium für das Verwerfen der Nullhypothese dient die Teststatistik. Das Prinzip besteht in der Bildung einer Prüfgröße T, die so konstruiert wird, daß die zugehörige Verteilung bezüglich H_0 oder mindestens deren α-Quantile tabelliert vorliegen. Ein je nach Testart durchgeführter Vergleich zwischen T und dem zugehörigen tabellierten Quantil für eine gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit α führt dann zu der Entscheidung, ob H_0 verworfen werden kann oder nicht (36).

Zur Überprüfung der oben genannten Fragestellung wurde der WILCOXON-Differenztest gewählt, ein Zweistichprobentest für verbundene Stichproben. Hierbei wird untersucht, ob auftretende Differenzen zwischen zugehörigen Elementen der einen Stichprobe (Wachstum unter TC-Einfluß) und der anderen Stichprobe (z.B. GPA unter TC-Einfluß) zufallsbedingt sind oder nicht (36). Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 0,05 im zweiseitigen Test gewählt.

L I T E R A T U R

1. BERGAN, T. und N. HØIBY : Epidemiological markers for Pseudomonas aeruginosa (6): Relationship between concomitant non-mucoid and mucoid strains from the respiratory tract in Cystic Fibrosis patients. Acta path. microbiol. scand. Sect. B 83, 553 - 560 (1975)

2. BOETHLING, R.S. : Regulation of extracellular protease secretion in Pseudomonas maltophilia. J. Bacteriol. 123, 954 - 961 (1975)

3. BOTH, G.W., J.L.McINNES, J.E.HANLON, B.K.MAY und W.H. ELLIOTT : Evidence for an accumulation of messenger RNA specific for extracellular protease and its relevance to the mechanism of enzyme secretion in bacteria. J. Mol. Biol. 67, 199 - 217 (1972)

4. CANCEDDA, R. und M. J.SCHLESINGER : Localization of polyribosoms containing alkaline phosphatase nascent polypeptides on membranes of Escherichia coli. J. Bacteriol. 117, 290 - 301 (1974)

5. CHOPRA, I. und T.G. B.HOWE : Bacterial resistance to the tetracyclines. Microbiol. Rev. 42, 707 - 724 (1978)

6. CIOMANEC, J.F. und I.A.HOLDER : Growth of Pseudomonas aeruginosa in normal and burned skin extract: Role of extracellular proteases. Infect. Immun. 25, 477 - 483 (1979)

7. COSTERTON, J.W. : Pseudomonas aeruginosa in nature and disease. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 15 - 24. Hans Huber Publishers, Bern 1980

8. DAATSELAAR, M.C.C. und W.HARDER : Some aspects of the regulation of the production of extracellular proteolytic-enzymes by a marine bacterium. Arch. Microbiol. 101, 21 - 34 (1974)

9. DIAZ, F., L.L.MOSOVICH und E.NETER : Serogroups of Pseudomonas aeruginosa and the immune response of patients with Cystic Fibrosis. J. Infect. Dis. 121, 269 - 274 (1974)

10. DÖRING, G.: Hygieneinstitut der Universität Tübingen, Abt. für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene - Persönliche Mitteilung.

11. DÖRING, G., H.J. OBERNESSER und K. BOTZENHART : Extrazelluläre Toxine von Pseudomonas aeruginosa (II): Einwirkung zweier gereinigter Proteasen auf die menschlichen Immunglobuline IgG, IgA und sekretorisches IgA. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 249, 89 - 98 (1981)

12. DÖRING, G., H.J. OBERNESSER und K. BOTZENHART : Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa (III): Radioimmunoassay for detection of alkaline protease. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 252, 239 - 247 (1982)

13. DOGGETT, R.G. und G. M.HARRISON : Significance of the bacterial flora associated with chronic pulmonary disease in Cystic Fibrosis. Proceedings of the 5th International Cystic Fibrosis Conference, Cambridge, September 1969. Hrsg. von D.LAWSON. Seite 175 - 188. Cystic Fibrosis Research Trust, London 1969

14. DOGGETT, R.G., G.M. HARRISON und R.E. CARTER Jr. : Mucoid Pseudomonas aeruginosa in patients with chronic illness. Lancet 1, 236 - 237 (1971)

15. FARMER, J.J. : Pseudomonas in the hospital. Hospital practice 11, 63 - 70 (1976)

16. FINLAND, M. : Changing ecology of bacterial infections as related to antibiotic therapy. J. Infect. Dis. 122, 419 - 431 (1970)

17. FINLAND, M., W.F. JONES Jr. und M.W. BARNESS : Occurrence of serious bacterial infections since introduction of antibacterial agents. J. Amer. Med. Assoc. 170, 2188 - 2197 (1959)

18. FISCHER, E. und V. BRAUN : Die Penetrationsbarriere der Bakterienzellwand als Ursache der Antibiotikaresistenz. Immun. Infekt. 9, 78 - 87 (1981)

19. GEDDES, A.M. : Other infections. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 89 - 100. Hans Huber Publishers, Bern 1980

20. GEMMELL, C.G. und A.M.SHIBL : The control of toxin and enzyme biosynthesis in Staphylococci by antibiotics. Staphylococci and Staphylococcal diseases. Hrsg. von J.JELJASZEWICZ. Seite 657 - 664. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1976

21. GILARDI, G.L. : Medical microbiology. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 25 - 30. Hans Huber Publishers, Bern 1980

22. GLENN, A.R. : Production of extracellular proteins by bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 30, 41 - 62 (1976)

23. GLENN, A.R., G.W. BOTH, J.L.McINNES, B.K.MAY und W.H. ELLIOTT : Dynamic state of the messenger RNA pool specific for extracellular protease in Bacillus amyloliquefaciens: Its relevance to the mechanism of enzyme secretion. J. Mol. Biol. 73, 221 - 230 (1973)

24. GLEW, R.H. und E.C. HEATH : Studies on the extracellular alkaline phosphatase of Micrococcus sodonensis (II): Factors affecting secretion.
J. Biol. Chem. 246, 1566 - 1574 (1971)

25. GOULD, A.R., B.K.MAY und W.H.ELLIOTT : Accumulation of messenger RNA for extracellular enzymes as a general phenomena in Bacillus amyloliquefaciens.
J. Mol. Biol. 73, 213 - 219 (1973)

26. GOVAN, J.R.W. und J. A.M.FYFE : Mucoid Pseudomonas aeruginosa and Cystic Fibrosis: Resistance of the mucoid form to Carbenicillin, Flucloxacillin and Tobramycin and the isolation of mucoid variants in vivo.
J. Antimicrob. Chemother. 4, 233 - 240 (1978)

27. GRAY, L. und A.KREGER : Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by Pseudomonas aeruginosa proteases.
Infect. Immun. 23, 150 - 159 (1979)

28. HOLDER, I.A. und C. G.HAIDARIS : Experimental studies of the pathogenesis of infections due to Pseudomonas aeruginosa: Extracellular protease and elastase as in vivo virulence factors.
Can. J. Microbiol. 25, 593 - 599 (1979)

29. HØIBY, N. : Prevalence of mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa in bacteriological specimens from patients with Cystic Fibrosis and patients with other diseases.
Acta path. microbiol. scand. Sect. B 83, 549 - 552 (1975)

30. HØIBY, N. : Pseudomonas aeruginosa infection in Cystic Fibrosis: Diagnostic and prognostic significance of Pseudomonas aeruginosa precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis, a survey.
Acta path. microbiol. scand. Sect. C (suppl.) 262, 1 - 96 (1977)

31. KAWAHARAJO, K., C. ABE, J.Y.HOMMA, M. KAWANO, E.GOTOH, N. TANAKA und K.MORIHARA : Corneal ulcers caused by protease and elastase from Pseudomonas aeruginosa. Japan. J. Exp. Med. 45, 435 - 442 (1975)

32. KAWAHARAJO, K., J.Y. HOMMA, Y.AOYAMA, K. OKADA und K. MORIHARA : Effects of protease and elastase from Pseudomonas aeruginosa on skin. Japan. J. Exp. Med. 45, 79 - 88 (1975)

33. KAWAHARAJO, K., J.Y. HOMMA, Y.AOYAMA und K.MORIHARA : In vivo studies on protease and elastase from Pseudomonas aeruginosa. Japan. J. Exp. Med. 45, 89 - 100 (1975)

34. KLINGER, J.D., D.C. STRAUSS, C.B.HILTON und J.A.BASS : Antibodies to proteases and exotoxin-A of Pseudomonas aeruginosa in patients with Cystic Fibrosis: Demonstration by radioimmunoassay. J. Infect. Dis. 138, 49 - 58 (1978)

35. KOBAYASHI, A., J.A. BARNETT und J.P.SANFORD : Effects of antibiotics on the in vitro production of α-hemolysin by Staphylococcus aureus. J. Lab. Clin. Med. 11, 890 - 894 (1966)

36. KOLLEGIUM BIOMATHEMATIK NORDRHEINWESTFALEN : Biomathematik für Mediziner. Hrsg. von A.HEINECKE, E.HULTSCH, R.NIENHAUS, A.REISCH und F.WINGERT. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1976

37. KREGER, A.S. und L. D.GRAY : Purification of Pseudomonas aeruginosa protease and microscopic characterization of pseudomonal protease-induced rabbit corneal damage. Infect. Immun. 19, 630 - 648 (1978)

38. KULCZCKI, L.L., T.M. MURPHY und J.A.BELLANTI : Pseudomonas colonization in Cystic Fibrosis: A study of 160 patients. J. Am. Med. Assoc. 240, 30 - 34 (1978)

39. [illegible], [illegible] und [illegible]: [illegible] usi[illegible]g [illegible] [illegible] and [illegible] [illegible] [illegible]. [illegible], [illegible] - [illegible] ([illegible])

40. L[illegible], [illegible]: [illegible] of ex[illegible]acellular [illegible]. [illegible] Soc. [illegible] [illegible], [illegible] - [illegible] ([illegible])

41. L[illegible], [illegible]: Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. (suppl.) 130, 594 - 599 (1974)

42. LIU, P.V.: Toxins of Pseudomonas aeruginosa. Pseudomonas aeruginosa: Clinical manifestations of infection and curre[illegible] [illegible]y. Hrsg. von [illegible] [illegible] te 63 - [illegible]. [illegible] Press, [illegible] York [illegible]

43. [illegible], [illegible]: [illegible] te[illegible] on [illegible] and lipase formation of Staphylococcus a[illegible]. [illegible] [illegible], [illegible] - [illegible] ([illegible])

44. MORIHARA, [illegible]: Pseudomonas aeruginosa proteinase (I): Purification and general properties. Biochim. Biophys. Acta [illegible], [illegible] - [illegible] ([illegible])

45. MORIHARA, K.: Production of elastase and proteinase by Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 88, 745 - 75[illegible] ([illegible]4)

46. MORIHARA, [illegible] und [illegible] T[illegible]: Pseudomonas aeruginosa peptide peptidohydrolase (III): Some characters as a Ca-metalloenzyme. Biochim. Biophys. Acta [illegible], [illegible] - [illegible] ([illegible]4)

47. [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible] und [illegible]: Pseudomonas aeruginosa elastase: isolation, crystallization and preliminary characterization. J. Biol. Chem. 240, 3295 - 3304 (1965)

48. MORIHARA, K. und H. TSUZUKI : Pseudomonas aeruginosa elastase: Affinity chromatography and some properties as a metallo-neutral proteinase. Agric. Biol. Chem. (Tokyo) 39, 1123 - 1128 (1975)

49. MORIHARA, K. und H. TSUZUKI : Production of protease and elastase by Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients. Infect. Immun. 15, 679 - 685 (1977)

50. MØLLER, N.E. und N. HØIBY : Antibiotic treatment of chronic Pseudomonas aeruginosa infection in Cystic Fibrosis. Scand. J. Infect. Dis., suppl. 29, 87 - 91 (1981)

51. MÜLLER, H.E. : Methodische Untersuchungen in vitro zur Einwirkung bakterieller Proteasen auf menschliche Plasmaeiweißkörper, dargestellt am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 216, 79 - 87 (1971)

52. MUSZYNSKI, Z. : Enzymatic and toxinogenic activity of culture filtrates of high and low virulent strains of Pseudomonas aeruginosa on mice. Path. Microbiol. 39, 135 - 147 (1973)

53. NIERHAUS, K.H. : Antibiotika als Inhibitoren der bakteriellen Proteinbiosynthese: Wirkungsweise und Resistenzmechanismen. Immun. Infekt. 9, 88 - 98 (1981)

54. NIESSEN, K.H. : Universitätskinderklinik Tübingen, Abt. Allgemeine Kinderheilkunde mit Poliklinik - Persönliche Mitteilung.

55. NORRBY, R. : Current status of Pseudomonas infections and antibiotics. Scand. J. Infect. Dis., suppl. 29, 81 - 86 (1981)

[illegible] — Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa (1[illegible]): [illegible] [illegible] for detection [illegible]. [illegible] 2[illegible]2, 2[illegible] - [illegible] ([illegible])

[illegible] — [illegible] 5[illegible], [illegible] ([illegible])

5[illegible]. [illegible] and [illegible] : [illegible]eudomonas pneumonia. [illegible] J. [illegible]ed. 55, 155 - 15[illegible] ([illegible])

59. [illegible], [illegible] und [illegible] : [illegible]rotease activities during the course of sporulation [illegible] Bacillus subtilis. J. [illegible]act. [illegible]07, 815 - 823 (197[illegible])

60. PRIEST, F.G. : Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. Bacteriol. Rev. 41, 711 - 753 (1977)

61. PRUITT, B.A., Jr. : Infections of burns and other wounds caused by Pseudomonas aeruginosa. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 55 - 70. Hans Huber Publishers, Bern 1980

62. [illegible]ULVERER, G., Z. WEGRZYNOWICZ, H.L. KO, und J.JELJASZEWICZ : Influence of Pseudomonas aeruginosa proteases on prothrombin, plasminogen and fibrinogen. Zbl. Bakt. Hyg. I. [illegible] Orig. [illegible] 24[illegible], [illegible] - [illegible] ([illegible])

[illegible]3. [illegible], [illegible] und R.[illegible].FICK : Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. [illegible]. Seite [illegible] - [illegible]. Hans Huber Publishers, Bern [illegible]

64. RHAME, F.S. : The ecology and epidemiology of Pseudomonas aeruginosa. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 31 - 51. Hans Huber Publishers, Bern 1980

65. RICHMOND, M.H. : Resistance of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 176 - 192. Hans Huber Publishers, Bern 1980

66. ROE, E.A. und R.J. JONES : Intracellular killing of different strains of Pseudomonas aeruginosa by human leukocytes. Brit. J. Exp. Path. 55, 336 - 343 (1974)

67. SANDE, M.A. und G.L. MANDELL : Tetracyclines and Chloramphenicol. The pharmacological basis of therapeutics. Hrsg. von A.GOODMAN-GILMAN, L.S.GOODMAN und A. GILMAN. Seite 1181 - 1199. 6. Auflage, MacMillan Publishing Co., Inc., New York 1980

68. SANDERSON, K.E., T. J.MacALISTER, J.W. COSTERTON und K.J. CHENG : Permeability of lipopolysaccharide-deficient (rough) mutants of Salmonella typhimurium to antibiotics, lysozyme and other agents. Can. J. Microbiol. 20, 1135 - 1145 (1974)

69. SCHIMPFF, S.C., W.H. GREENE, V.M.YOUNG und P.H.WIERNICK : Significance of Pseudomonas aeruginosa in the patient with leukemia or lymphoma. J. Infect. Dis. (suppl.) 130, 24 - 32 (1974)

70. SEMETS, E.V., A.R. GLENN, B.K.MAY und W.H.ELLIOTT : Accumulation of messenger ribonucleic acid specific for extracellular protease in Bacillus subtilis 168. J. Bacteriol. 116, 531 - 534 (1973)

[illegible]	[illegible] und [illegible] :	Regulation of galactose oxydase synthesis and secretion in Dactylium dendroides: Effects of pH and culture density. J. Bacteriol. 130, 455 - 463 ([illegible])
72.	[illegible] L, A.P. :	Selective inhibition of hemolysin production by Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 250, 42 - 4[illegible] ([illegible])
73.	SHIBL, A.M. und I.A. AL-SOWAYGH :	Differential inhibition of bacterial growth and hemolysin production by lincosamide antibiotics. J. Bacteriol. 137, 1022 - 1023 (1979)
74.	SHIBL, A.M. und I.A. AL-SOWAYGH :	Antibiotic inhibition of protease production by Pseudomonas aeruginosa. J. Med. Microbiol. 13, 345 - 349 (1980)
75.	SIEGENTHALER, W., P. FUCHS und R.L[illegible]HY :	[illegible]reatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. [illegible].H. Seite 1[illegible] - 1[illegible]. Hans Huber Publishers, Bern [illegible]
76.	SWELL, L., I.I.MIL-DER, S.A.LEPPLAN und C.B.SNELINGER :	Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infections with Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 19, 839 - 845 (1978)
77.	STEIGLEDER, G.K. :	Dermatologie und Venerologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, [illegible] [illegible]
78.	STI[illegible], [illegible] und J. M.MERRICK :	Extracellular enzyme secretion by Pseudomonas lemoghei. J. Bacteriol. 119, 152 - [illegible] (1974)
79.	STINSON, M.W. und P. HAYDEN :	Secretion of phospholipase-C by Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 25, 558 - [illegible] (1979)

80. TANAKA, S. und S. IUCHI : Induction and repression of an extracellular proteinase in Vibrio parahaemolyticus.
Biken J. 14, 81 - 96 (1971)

81. WALTER, A.M. und L. HEILMEYER : Antibiotikafibel.
Hrsg. von M.PLEMPEL, H.OTTEN und W.SIEGENTHALER.
4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975

82. WECKERESSER, J. und J.A.MAGNUSON : Lightinduced, carrier-mediated transport of tetracycline by Rhodopseudomonas sphaeroides.
J. Bacteriol. 138, 678 - 683 (1979)

83. WITTE, W. : Control of α-hemolysin formation by plasmids in distinct strains of Staphylococcus aureus: Influence of Erythromycin, Rifampicin and Streptomycin.
Staphylococci and Staphylococcal diseases. Hrsg. von J.JELJASZEWICZ. Seite 297 - 305.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1976

84. WRETLIND, B., L.SJÖBERG und T.WALDSTRÖM : Protease deficients mutants of Pseudomonas aeruginosa: Pleiotropic changes in activities of other extracellular enzymes.
J. Gen. Microbiol. 103, 329 - 336 (1977)

85. ZAK, O. : Antibiotics and Pseudomonas aeruginosa.
Pseudomonas aeruginosa: The organism, diseases it causes and their treatment. Hrsg. von L.D. SABATH. Seite 133 - 159.
Hans Huber Publishers, Bern 1980

Lebenslauf

Am 6.9.1958 wurde ich, Andreas Stadler, als Sohn des Arztes Peter Stadler und seiner Ehefrau Erika, geborene Schreiner, in Berlin-Schöneberg geboren.

Von 1958 bis 1965 wuchs ich auf Sulawesi und Buton in Indonesien auf, wo mein Vater als Regierungsarzt tätig war. Vom Herbst 1962 bis zum Frühjahr 1963 hielt ich mich mit meiner Mutter vorübergehend in München auf. 1964 und 1965 besuchte ich eine Volksschule auf Buton und erhielt Heimunterricht von meiner Mutter.

1965 kehrte die Familie nach Deutschland zurück. Ich besuchte die 2. und 3. Klasse der Volksschule in München.

Von 1967 bis 1969 hielt ich mich in Pagouda in Togo auf, wo mein Vater im Rahmen der Entwicklungshilfe tätig war. Ich besuchte dort eine Volksschule und erhielt Heimunterricht von meiner Mutter. 1969 trat ich in das Internat LEH Neubeuern in Neubeuern ein und blieb dort bis zu meinem Abitur im Frühjahr 1977.

Im Wintersemster 1977/78 begann ich das Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen. Im August 1979 legte ich dort das Physikum ab und wechselte zum Wintersemester 1979/80 an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen Im August 1980 legte ich dort den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im März 1983 legte ich dort den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab und ging anschließend für das Praktische Jahr an das Städtische Krankenhaus Friedrichshafen am Bodensee.

Am 16.4.1984 legte ich das Staatsexamen ab.